

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

TOME QUATRE-VINGT-NEUVIÈME

Juillet-Décembre 1955

QR.

1

A475

v. 89

July-Dec.

1955

PER

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

ANNALLES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1955

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

**ACTION PHAGOCYTAIRE ET DESTRUCTRICE
DE *HARTMANELLA CASTELLANII* (*AMOEBA CASTELLANII*)
SUR UN CHAMPIGNON LEVURIFORME
ENCAPSULÉ PATHOGÈNE *TORULOPSIS NEOFORMANS*
(*CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*)**

par ALDO CASTELLANI (*).

(Institut de Médecine Tropicale de Lisbonne)

L'amibe, ou plus exactement, la *Hartmanella*, que j'ai décrite en 1930 et à laquelle Mackenzie Douglas a donné le nom spécifique de *castellanii*, phagocyte et détruit de nombreuses espèces bactériennes, mais pas toutes. Par exemple, elle phagocyte et détruit *Salmonella typhosa*, mais non *Proteus morgani*, qui peuvent être ainsi différenciés par un « Amoebo-test », outre les autres méthodes de différenciation. Quoique cette amibe ait été trouvée par moi pour la première fois sur une culture de champignon (champignon levuriforme, anascospore, non capsulé, non pathogène, produisant des colonies rouges), son action sur les champignons en général n'a pas été beaucoup étudiée et est, en fait, très peu connue. Au cours des trois dernières années, je me suis occupé de la question dans le but principalement de voir si l'amibe avait un pouvoir phagocytaire et destructeur sur un champignon pathogène levuriforme capsulé bien connu, *Toru-*

(*) Manuscrit reçu le 30 mars 1955.

loopsis neoformans, bien étudié en France par G. Segretain et E. Drouhet, et contre lequel on ne possède encore aucune thérapeutique, les sulfamides et les antibiotiques étant sans action.

Hartmanella castellanii ne se développe sur aucun des milieux usuels à moins qu'elle soit cultivée en même temps que d'autres microorganismes, bactéries ou mycètes, vivants ou morts. On

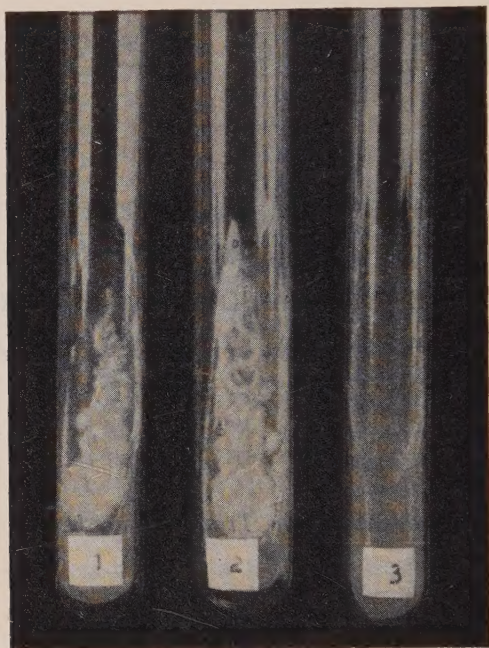


FIG. 1. Tube n° 1. — Culture de *Torulopsis neoformans* sur gélose glucosée, témoin. Tube n° 2. — Culture de *Torulopsis neoformans* une semaine après inoculation avec *Hartmanella castellanii*. Tube n° 3. — Culture de *Tolulopsis neoformans* sur gélose glucosée deux semaines après inoculation avec *Hartmanella castellanii*.

trouvera les détails de la technique de culture dans mes anciens travaux publiés dans le *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* de Londres, en 1930-1932, et dans les travaux de Mackenzie Douglas, van Rooyen et autres auteurs dans le même périodique.

Pour mes récentes expériences, j'ai employé une souche cultivée en association avec un *Alcaligines* (*A. alcalofoetidus*) et un *Proteus* qui ont perdu tout pouvoir pathogène, leur inoculation ne tuant pas le cobaye et autres petits animaux de laboratoire. Les cultures contenant l'amibe ne tuent pas non plus ces animaux.

L'amibe associée à ces bactéries se développe abondamment sur la gélose glucosée ; elle meurt sur la gélose simple, quoique les bactéries continuent à très bien pousser. Pour maintenir l'amibe vivante, il suffit de repiquer la culture de l'amibe et des bactéries une fois par mois sur gélose glucosée à 2 p. 100. Tenir les tubes

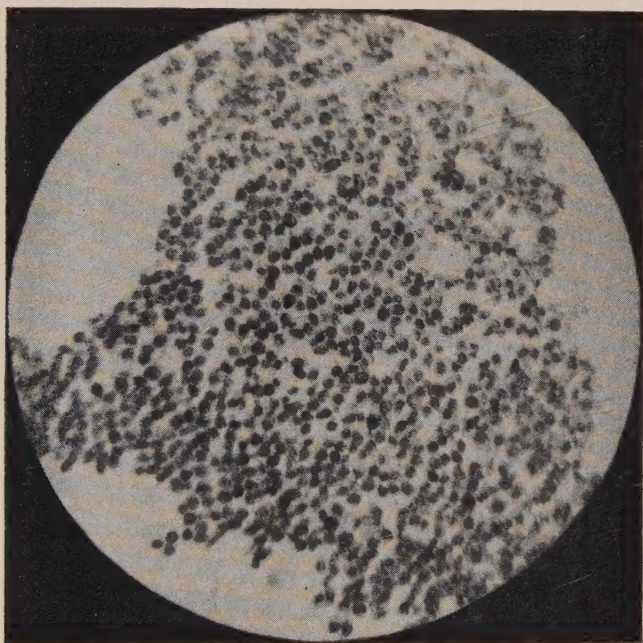


FIG. 2. — Préparation microscopique d'une culture témoin de *Torulopsis neoformans* sur gélose glucosée.

à la température du laboratoire, et faire les expériences à cette température, ou à une température de 18° à 28° C.

EXPÉRIENCES. — J'ai fait de nombreuses expériences différentes dont je donnerai les détails dans une autre publication. Dans cette note préliminaire, je me bornerai à décrire seulement une expérience que j'ai répétée plus de vingt fois, toujours avec les mêmes résultats :

1° Un tube de gélose glucosée est inoculé avec *Torulopsis neoformans*, et conservé comme témoin.

2° Une culture sur gélose glucosée de *Torulopsis neoformans* âgée d'une semaine est inoculée avec la culture de *Hartmanella*

castellanii ci-dessus mentionnée, c'est-à-dire *amibe* + *Alcaligenes alcalofætidus* + *Proteus*.

3° Une culture sur gélose glucosée de *Torulopsis neoformans* âgée d'une semaine est inoculée avec l'*Alcaligenes* et le *Proteus* sans amibe.

Les trois tubes sont examinés macroscopiquement et microscopiquement une fois par semaine pendant trois semaines.

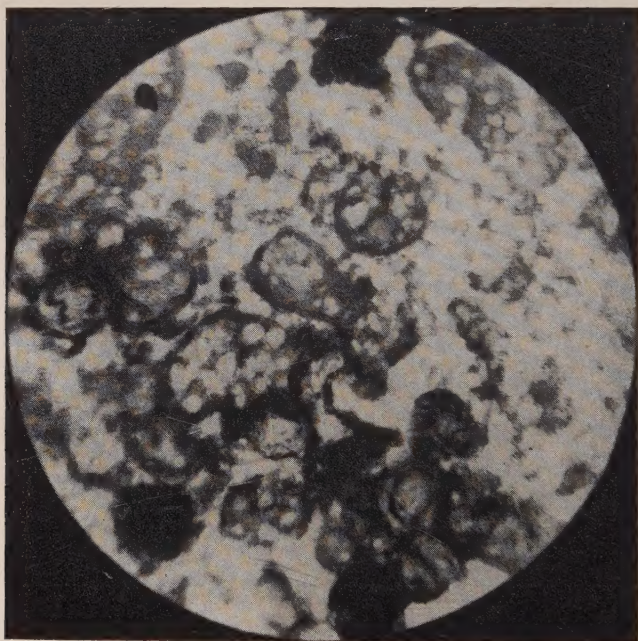


FIG. 3. — Préparation microscopique d'une culture de *Torulopsis neoformans* une semaine après inoculation avec *Hartmanella castellanii*. Noter les amibes engorgées de cellules levuriformes.

RÉSULTATS. — *Tube n° 1.* — La culture de *Torulopsis* complètement développée et servant de témoin reste pendant trois semaines à peu près stationnaire, quelquefois ses dimensions augmentent, souvent elle devient un peu jaunâtre.

Microscopiquement, on voit des cellules levuriformes en nombre considérable. Elles semblent conserver la même forme et le même aspect, sans aucune formation de pseudomycélium. On ne voit pas de formes dégénérées, vacuolisées, ou elles sont extrêmement rares.

Tube n° 2 (culture de *Torulopsis neoformans* âgée d'une semaine inoculée avec *Hartmanella castellanii*). — Macroscopiquement, une semaine après l'inoculation, on constate une croissance amoindrie, l'épaisseur est diminuée et la culture est un peu transparente. Ces caractères sont beaucoup plus évidents après deux semaines et encore plus après trois semaines. L'examen microscopique montre, après une semaine, un nombre considé-

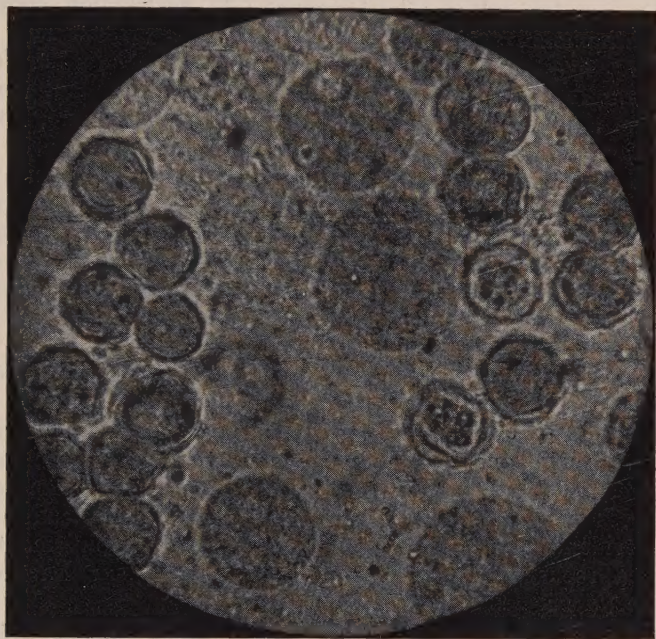


FIG. 4. — Préparation microscopique d'une culture de *Torulopsis neoformans* sur gélose glucosée deux semaines après inoculation avec *Hartmanella castellanii*. Noter les formes végétatives et kystes de l'amibe, et la disparition presque complète du champignon.

table d'amibes engorgées d'éléments levuriformes ; les kystes amibiens sont en petit nombre, les éléments levuriformes libres sont beaucoup moins nombreux et beaucoup d'entre eux sont en dégénérescence et vacuolisés.

Après la deuxième semaine, l'examen microscopique montre encore une abondance d'amibes adultes (trophozoïtes), mais aussi un grand nombre de kystes. Le champignon libre a presque disparu, on voit quelques rares éléments levuriformes, souvent dégénérés et, phénomène intéressant, on constate quelquefois une faible formation de pseudomycélium.

Après la troisième semaine, l'examen microscopique montre que l'épaisseur de la culture a encore diminué et que son amincissement est encore plus marqué. Le champignon a complètement disparu ou presque (la disparition complète est cependant exceptionnelle, le champignon pouvant être cultivé dans presque tous les cas, quoique très mal). Il s'agit là d'un fait un peu analogue — si l'on peut comparer un phénomène de phagocytose avec un phénomène lytique — à ce qu'on observe avec le bactériophage sur les cultures bactériennes : la destruction complète est exceptionnelle.

Tube n° 3. — Le troisième tube est une culture de *Torulopsis neoformans* âgée d'une semaine, inoculée avec le mélange bactérien (sans amibe) *A. alcalofætidus* + *Proteus* mentionné, comme le *pabulum* de l'amibe. Examiné macroscopiquement après une, deux ou trois semaines, il n'a pas perdu son épaisseur, mais l'aspect crémeux a disparu très rapidement. L'examen microscopique après une, deux et trois semaines montre que le champignon est présent à peu près en même quantité, mais il y a aussi de nombreuses bactéries mobiles. Il n'y a pas d'antagonisme évident entre les bactéries et le champignon.

CONCLUSION. — En suivant la technique que j'ai employée, il est facile de démontrer que *Hartmanella castellanii* a une puissante action destructrice sur *Torulopsis neoformans*. Cette action n'est très probablement qu'un phénomène de phagocytose intense avec digestion intracellulaire des éléments libres du champignon, puisque les filtrats de cultures de *Hartmanella* n'ont aucune action lytique évidente sur le champignon. Ces résultats confirment mes anciennes recherches et celles de van Rooyen sur l'action de *Hartmanella* sur les bactéries.

Il serait sans doute utile de continuer et étendre à des études *in vivo* les recherches que j'ai brièvement décrites, en espérant qu'avec beaucoup de travail et un peu de chance, on pourrait peut-être découvrir une application thérapeutique pratique contre la maladie mortelle provoquée par ce champignon et contre laquelle, jusqu'à présent, la médecine ne possède aucun moyen de lutte.

Je serais très heureux d'envoyer des cultures de *Hartmanella castellanii* aux collègues qui le désireraient.

BIBLIOGRAPHIE

- A. CASTELLINI. *J. trop. Med.*, 1930, **33**, 160.
- A. CASTELLANI. *J. trop. Med.*, 1930, **33**, 221.
- A. CASTELLANI. *J. trop. Med.*, 1930, **33**, 188.
- A. CASTELLANI. *J. trop. Med.*, 1930, **33**, 237.

- A. CASTELLANI. *J. trop. Med.*, 1931, **34**, 83.
A. CASTELLANI. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, 1932, **25**, 219.
M. DOUGLAS. *J. trop. Med.*, 1930, **33**, 258.
E. DROUHET et G. SEGRETAIN. *Rev. Pathol. comp.*, 1950, **50**, 37.
R. CAILLEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 990.
R. CAILLEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 721.
IACONO. *Annali Med. nav. col.*, 1933, **39**.
C. E. VAN ROOYEN. *J. trop. Med.*, 1932, **35**, 118.
C. E. VAN ROOYEN. *J. trop. Med.*, 1932, **35**, 259.
M. VOLKONSKY. *Arch. Zool. exper.* 1931, **72**, 317.

ÉTUDE D'UNE SOUCHE ATTÉNUÉE DE VIRUS DU MYXOME (URIARRA III D'AUSTRALIE)

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT (*)

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie animale)

La souche Uriarra III dérive d'un virus qui a été trouvé chez des lapins sauvages dans la région de Canberra.

Selon Fenner et Marshall, son pouvoir pathogène est un peu supérieur à celui du virus de Mykytowycz, mais inférieur à celui du virus standard de nos collègues d'Australie ; inoculée à leurs lapins de laboratoire la souche Uriarra III donne une maladie dont la durée n'est jamais inférieure à vingt-cinq jours.

Nous nous sommes proposé d'étudier son action sur le lapin commun des clapiers français, dont la réceptivité à la myxomatose s'est traduite, jusqu'à présent, par une mortalité de presque 100 p. 100 chez les sujets atteints.

EXAMEN PRÉLIMINAIRE DE LA SOUCHE URIARRA III.

1° Dès réception du matériel en glycérine on a fait une suspension au 1/100 du myxome virulent pour inoculer deux lapins, n^{os} 259 et 5951, chacun d'eux recevant 1 cm³ de cette suspension sous la peau du front. (Pour permettre d'évaluer la teneur du matériel d'origine en unités virulentes, d'autres lapins ont reçu, sous le même volume, les dilutions 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ et 10⁻⁶ du virus ; seul d'entre eux, celui qui avait reçu la dilution 10⁻³ [n^o 247] a contracté la maladie, les autres restant indemnes et réceptifs).

2° Trois mois après, un fragment du myxome d'origine a été mis en suspension au 1/20 ; le lapin 440 en a reçu 0,5 cm³ sous la peau du front et le lapin 441, 0,25 cm³ dans chaque testicule.

Les suites de ces inoculations sont réunies dans le tableau I. Dans ce tableau et dans les suivants, nous qualifierons de clas-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 avril 1955.

(1) Nous remercions vivement ici MM. F. Fenner, de Canberra, et P. Lépine, de Paris, à l'obligeance desquels nous devons d'avoir disposé de cette souche.

siques les manifestations pathologiques comparables à celles que l'on observe chez les lapins de France à la suite de l'inoculation d'une souche pleinement virulente du virus du myxome.

TABLEAU I.

Numéro du lapin	Caractères de la maladie.	Terminaison
259	Evolution classique	Mort en 15 jours
5951	Début classique puis maladie nodulaire	Guérison ; disparition des lésions en 7 semaines
247	Maladie nodulaire Paraplégie concomitante	Mort en 27 jours
440	Maladie classique	Mort en 34 jours
441	Maladie classique	Mort en 33 jours.

Ainsi, de ces cinq lapins inoculés, l'un a contracté une myxomatose classique, trois autres une maladie à issue fatale mais retardée, et le cinquième a guéri.

PASSAGES EN SÉRIE PAR COHABITATION.

Deux séries de passages ont été effectuées. Les lapins 259 et 5951 ont été pris comme sources de contagion dans la première expérience et le lapin 440 dans la seconde. Pour chaque passage un lapin neuf était mis dans la cage d'un malade à partir du jour où celui-ci présentait les premiers signes de myxomatose ; la cohabitation était étroite, dans une cage exiguë ; les deux animaux restaient ensemble jusqu'à l'apparition des premiers signes chez le lapin neuf ou, éventuellement, jusqu'à la mort du lapin malade. Et les passages se poursuivaient, chaque nouveau lapin contaminé étant appelé à contaminer un lapin neuf.

Rien ne permettant de connaître le moment précis où la contamination s'est effectuée, il n'a pas été possible de chiffrer la durée des périodes d'incubation, mais on a toujours pu établir ou sa limite maximale (M) ou sa limite minimale (m), et parfois les deux.

Cinq passages ont été réalisés dans la première expérience et quatre dans la deuxième (tableau II).

TABLEAU II.

Passages	Lapin contaminant	Lapin contaminé			
		Numéros	Incubation	Evolution	Terminaison
I	5951 - Inoculé Maladie suivie de guérison.	349	9 jours M	Maladie nodulaire	Guérison
I	259 - Inoculé Myxomatose mor- telle en 15 jours	335	17 jours m	10 jours. Maladie classique	Mort
I	259 - id.	348	4 à 8 jours	26 jours. Maladie nodulaire	Mort
II	348	370	13 jours M	8 jours. Maladie classique	Mort
III	370	56	7 jours M	24 jours. Maladie nodulaire	Guérison
IV	56	115	7 jours M	27 jours. Maladie nodulaire	Guérison
V	115	311	13 jours M	10 jours. Maladie classique	Mort
I	440 - Inoculé. Myxomatose mor- telle en 34 jours	442	14 jours M	11 jours. Maladie classique	Mort
II	442	465	2 à 8 jours	26 jours. Maladie mixte	Mort
III	465	486	13 jours M	8 jours. Maladie classique	Mort
IV	486	408	8 à 15 jours	Maladie nodulaire	Guérison

L'examen de ce tableau conduit à la conclusion suivante : sur 11 lapins qui ont été contaminés par cohabitation au cours de passages en série, 4 ont guéri, 2 ont contracté une maladie dont l'évolution a été de plus de vingt-cinq jours et 5 une maladie ne différant pas ou différant peu de la myxomatose classique, si ce n'est par sa durée.

PASSAGES EN SÉRIE PAR MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE.

Comme le virus ordinaire du myxome, le virus Uriarra III se développe dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule en incubation ; sa culture y entraîne la formation d'œdèmes

en nappe, en trainées ou en réseau et de granulations parfois extrêmement nombreuses.

Nous avons effectué six passages successifs sur membrane en partant d'un petit myxome prélevé sur le lapin 335 mentionné dans le tableau II. Rappelons que ce lapin, soumis à la cohabitation avec un malade, avait contracté une myxomatose du type classique mortelle en dix jours, après une incubation d'au moins dix-sept jours. La première membrane inoculée, la cinquième et la sixième ont été mises en suspension pour l'inoculation d'un certain nombre de lapins (tableau III).

TABEAU III.

Origine de la suspension virulente	Lapins inoculés		
	Numéros	Caractères de la maladie	Terminaison
Membrane du 1 ^{er} passage	392	Maladie nodulaire	Mort en 31 jours
	393	Maladie mixte, compliquée de pleuro-pneumonie pasteurellique	Mort en 22 jours
	402	Maladie classique	Mort en 19 jours
	403	Maladie mixte	Guérison en 1 mois
Membrane du 5 ^{ème} passage	480	Début classique puis maladie nodulaire.	Guérison avec élimination lente des lésions
	484	Maladie classique	Mort en 10 jours
	485	Début classique puis maladie nodulaire	Guérison avec élimination lente des lésions
Membrane du 6 ^{ème} passage	606	Maladie classique atypique	Mort en 20 jours
	607	Maladie classique	Mort en 18 jours
	556	Maladie classique	Mort en 19 jours

Ainsi, sur les 10 lapins qui ont reçu les suspensions de membranes chorio-allantoïdiennes des premier, cinquième ou sixième passages, 3 ont guéri, 1 a contracté une myxomatose à évolution prolongée, 5 ont fait une maladie différant peu de la myxomatose classique, mais à issue retardée, 1 enfin s'est comporté comme s'il avait reçu un virus pleinement pathogène. Il n'apparaît pas, à l'examen de ce tableau, que le virus Uriarra III se soit sensiblement modifié au cours des passages sur l'embryon de poulet.

PASSAGES ALTERNÉS PAR LAPIN
ET PAR MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE.

En partant, comme dans l'essai précédent, du lapin 335, nous avons passé le virus Uriarra III sur membrane puis sur lapin, alternativement et cela trois fois consécutivement. Au cours de ces opérations, un certain nombre de lapins ont reçu les suspensions ou de myxomes après passage sur lapin ou de membranes après passage sur embryon (tableau IV).

TABLEAU IV.

Origine de la suspension virulente	Lapins inoculés		
	Numéros	Caractères de la maladie	Terminaison
Membranes de 2ème passage	439	Maladie classique	Mort en 20 jours
	438	Maladie classique	Mort en 18 jours
Lapin de 3ème passage	372	Maladie classique	Mort en 20 jours
	113	Maladie nodulaire	Guérison en 45 jours
Membranes de 3ème passage	452	Maladie mixte	Mort en 38 jours
	598	Maladie mixte	Mort en 27 jours
	599	Maladie mixte	Guérison en 2 mois
	600	Maladie mixte	Guérison en 2 mois

Les quatre derniers lapins figurant sur la liste ont été inoculés avec une suspension de membranes du virus ayant subi les trois passages sur lapin et les trois passages alternés sur embryon.

Ainsi, 8 lapins ont été inoculés, dont 3 ont guéri, 2 ont survécu plus de 25 jours et 3 ont contracté une maladie peu différente de la maladie classique ; les passages alternés n'ont pas modifié le pouvoir pathogène du virus.

INOCULATIONS CROISÉES AVEC UNE SOUCHE FRANÇAISE DU VIRUS.

a) *Inoculation première avec virus français et réinoculation avec virus Uriarra III.* — Quatre lapins ont été vaccinés au moyen de virus de Shope puis éprouvés par inoculation dans le délai de trois semaines, au moyen d'une souche pleinement virulente de virus du myxome. A la suite de cette épreuve, trois

d'entre eux ont fait une myxomatose légère, le quatrième une myxomatose grave. Quatre mois plus tard on leur inocule le virus Uriarra III en même temps qu'aux lapins neufs, 259, 5951 et 247 (voir tableau I). Les lapins réinoculés restent indifférents, les témoins 259 et 247 contractent une myxomatose mortelle, le témoin 5951 une maladie mixte qui guérit.

b) *Inoculation première avec virus Uriarra III et réinoculation avec virus français.* — Quatre lapins, qui avaient guéri d'une myxomatose plus ou moins atténuée à virus Uriarra III à la suite ou de l'inoculation ou d'une contamination par contact (n^{os} 5951, tableau I ; 349 et 56, tableau II ; 403, tableau III), sont réinoculés un mois après avec une souche française pleinement virulente : ils restent indifférents alors que le témoin neuf meurt, treize jours après cette épreuve, d'une myxomatose classique.

EMPLOI COMPARATIF DES DEUX VIRUS
POUR ÉPROUVER DES LAPINS VACCINÉS.

Au cours d'essais ayant pour objet de préciser le pouvoir vaccinant de certaines souches du virus de Shope à l'égard du virus du myxome, 9 lapins reçoivent d'abord une suspension de

TABLEAU V.

Numéros des lapins	Eprouvés avec virus français	Eprouvés avec virus australien	Témoins d'épreuve
224		Réaction inflammatoire locale sans plus. Guérison.	<u>Virus australien</u> Lapin 259 : myxomatose mortelle en 15 jours ; Lapin 5951 : maladie mixte et guérison.
225		id.	
226		Rien	
230		Maladie nodulaire Guérison.	
231		id.	
222	Myxomatose mortelle en 10 jours.		<u>Virus français</u> Lapins 286 et 285 : myxomatoses mortelles en 8 et 13 jours.
223	Réaction inflammatoire locale sans plus. Guérison.		
227	Myxomatose mortelle en 13 jours.		
228	Myxomatose mortelle en 21 jours.		

fibrome ; ils réagissent par la formation de tumeurs assez volumineuses (noix, figue). Six semaines après on les éprouve par inoculation ou de virus français pleinement pathogène ou de virus australien atténué (tableau V).

Ainsi, dans ce groupe de lapins faiblement immunisés, 5 qui ont été éprouvés avec le virus Uriarra III ont résisté sans troubles ou en ne présentant que de légers troubles ; au contraire, des quatre qui ont été éprouvés avec le virus français, un seulement a guéri sans troubles sérieux et trois sont morts de myxomatose, l'un avec un certain retard.

CONCLUSIONS.

1° Si l'on considère la durée des troubles à dater du jour où le virus a pénétré dans l'organisme, les 34 lapins qui ont été employés dans ces divers essais peuvent être répartis en trois groupes : 11 ont guéri, 8 ont succombé en vingt-cinq jours ou davantage, et 15 en moins de vingt-cinq jours. Parmi ceux-ci 5 ou 6 sont morts dans les mêmes délais et dans la même forme que des lapins inoculés avec une souche pleinement virulente (tableau VI).

TABLEAU VI. — Répartition globale des cas de myxomatose, d'après la durée de la maladie ^(°).

TABEAU	Classique	De 16 à 24 jours	De plus de 24 jours	Guérison
I	1		3	1
II	4 (°)	1	2	4
III	1	5	1	3
IV		3	2	3
	6	9	8	11
	15			

(°) Evaluation approximative.

Les animaux qui ont guéri ou sont morts dans des délais d'au moins vingt-cinq jours avaient contracté une myxomatose mixte ou purement nodulaire ; ceux qui sont morts dans des délais

inférieurs à vingt-cinq jours avaient contracté une maladie de type classique ou mixte.

2° La maladie déterminée par le virus Uriarra III se caractérise objectivement, dans la plupart des cas, par la réduction des œdèmes et la formation, souvent précoce, de petits myxomes noduleux dans les régions les plus diverses de la surface du corps. La localisation auriculaire de ces lésions mérite une mention ; elle donne au bord des conques une apparence sinueuse, festonnée, très particulière.

Cette forme anatomo-clinique de la myxomatose s'observe assez fréquemment chez les lapins qui sont soumis à l'action d'un virus pleinement pathogène, après avoir été immunisés par inoculation du virus du fibrome de Shope.

3° Les passages successifs que nous avons fait subir au virus Uriarra III : passages par lapin (inoculation et cohabitation), passages par membrane chorio-allantoïdienne, passages alternés par lapins et membranes, ne paraissent pas avoir modifié ses propriétés essentielles ; ce virus présente, dans la diversité de ses effets, une réelle stabilité.

4° Mais la diversité même des manifestations auxquelles il donne lieu, conduit à penser qu'il n'est pas pur ; les écarts que présentent ces manifestations sont le propre des lignées impures. L'hypothèse qui vient à l'esprit est celle d'un mélange en proportions variables, d'une souche pleinement pathogène et d'un mutant atténué.

5° L'apparition naturelle en Australie de virus du type Uriarra III autorise l'espoir que se présente un jour un mutant suffisamment atténué et qui se puisse isoler à l'état de pureté pour la vaccination des lapins contre la myxomatose.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COMPLÉMENT

I. INACTIVATION SPONTANÉE DANS LES CONDITIONS DE L'HÉMOLYSE. ACTION PROTECTRICE DES IONS CALCIUM.

par R. LAPORTE, L. HARDRÉ DE LOOZE et R. SILLARD (*).

(Institut Pasteur, Service de Sérologie)

Un caractère bien connu du complément est son instabilité. Même lorsqu'il est placé dans les conditions physico-chimiques où peuvent s'exercer ses actions biologiques, en particulier l'hémolyse, son activité baisse spontanément plus ou moins vite. Cette particularité rend très difficile l'évaluation quantitative précise des réactions dont le complément est la base. On est donc conduit à déterminer si, dans les limites de variation compatibles avec l'hémolyse, il existe des relations quantitatives entre les différents facteurs : concentration des réactifs, force et composition ioniques, pH, température..., et le degré d'inactivation spontanée du complément, afin d'établir les conditions optima où la destruction est la plus faible et de voir si elles coïncident avec le maximum de l'activité hémolytique.

C'est l'emploi de plus en plus étendu des réactions quantitatives de fixation du complément à 50 p. 100 d'hémolyse qui a conduit à préciser les conditions physico-chimiques assurant le moins de variation possible du pouvoir hémolytique. Deux nécessités sont apparues : pH optimum fixe et surtout présence de certains cations divalents, Mg^{++} en premier lieu, et aussi Ca^{++} , qui, à une concentration adéquate et d'ailleurs très faible, paraissent nécessaires pour assurer l'activité hémolytique maxima et pour obtenir des résultats réguliers [1, 2, 3]. Toutefois l'étude systématique de la dénaturation du complément dans les conditions compatibles avec l'hémolyse ne semble pas avoir beaucoup retenu l'attention. Pillemer et ses collaborateurs [4, 5] ont découvert le rôle stabilisateur remarquable des ions Ca^{++} qui entravent la détérioration spontanée, rapide à 37°, du premier composant du complément. Sur le plan de la sérologie pratique un travail récent [6] a mis en évidence les avantages de l'addition de quan-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 avril 1955.

tités minimales de chlorure de calcium dans l'eau salée utilisée pour le titrage préparatoire de la réaction de Kolmer. Si l'action du calcium n'a retenu l'attention que récemment, celle du magnésium qui augmente fortement l'activité hémolytique lorsqu'on l'ajoute au milieu à l'état de traces, était depuis longtemps connue [8], mais l'intérêt de cette découverte avait paru minime, les techniques de la réaction de fixation n'ayant d'ailleurs pas encore atteint la précision de celles qui ont été mises au point dans la suite. Nombre de sérologistes redoutent encore l'exactitude très poussée des méthodes par crainte d'augmenter exagérément la sensibilité de la réaction de fixation du complément au détriment de sa spécificité [7]. Une telle crainte paraissait fondée aussi longtemps que les variations des réactifs obligeaient à conserver une très large marge de sécurité, mais depuis qu'il est possible de préparer des antigènes avec des méthodes de moins en moins empiriques et que l'on sait standardiser aussi les autres réactifs (hémolysines, globules...), des conditions précises assurant le maximum de constance de l'activité du complément, bien loin de constituer une cause supplémentaire d'erreur possible, paraissent au contraire le meilleur moyen d'éliminer les perturbations fortuites (nous en verrons des exemples dans la suite) et d'assurer par là même une meilleure concordance des résultats obtenus par des sérologistes différents. Sur le plan pratique, aussi bien que théorique, la poursuite de ces recherches paraît donc fondée.

Techniques. — Préparation des réactifs.

L'étude quantitative de la destruction spontanée du complément dans des conditions variables nécessite une méthode rigoureuse afin de supprimer les causes fortuites d'erreur entraînant une inconstance des résultats.

1° *Nettoyage de la verrerie.* — Il doit être très minutieusement exécuté. Le procédé suivant, adopté après plusieurs essais, nous donne satisfaction : après brossage soigneux à l'eau courante et rinçage à l'eau distillée, la verrerie est maintenue une heure à 120° à l'autoclave dans une solution de PO_4HNa_2 à 2 p. 100 ; on la laisse ensuite dans ce bain refroidi jusqu'au lendemain, puis elle séjourne pendant cinq heures dans une solution faible de ClH ; on la rince alors à plusieurs reprises à l'eau courante, puis trois fois à l'eau distillée très pure. Egouttage et séchage dans l'étuve à 45°.

2° *Distribution et mesures des réactifs.* — On les effectue avec des pipettes de précision parfaitement propres. L'emploi de seringues automatiques pour répartir des volumes supérieurs à 0,5 cm³ est avantageux (rapidité et bonne précision). Ces instruments doivent être construits exclusivement en verre Pyrex et acier inoxydable, non seulement pour en permettre un nettoyage parfait, mais aussi pour éviter

d'introduire des traces de métaux nuisibles. Une cause d'erreur au début de nos recherches a été l'usage de « rhéomètres de Vernes » qui, même dans les modèles à seringue tout en verre, comportent des parties en maillechort (canon de la canule) ; des traces infinitésimales de cuivre étaient ainsi introduites, source d'erreur d'une importance insoupçonnée.

3° *Eau physiologique de base.* — Elle est préparée avec de l'eau distillée très pure servant aussi aux lavages et qui ne doit pas provenir d'un alambic en cuivre, même si elle est redistillée ensuite, car il est essentiel qu'elle soit exempte d'ions Cu^{++} . Nous utilisons de l'eau ayant subi les deux distillations successives dans des appareils entièrement construits en Pyrex.

L'eau physiologique contient 0,85 p. 100 de ClNa pour analyses (R. P. cu Merck). Il est utile d'assurer la constance du pH ; la formule d'eau physiologique de pH 7,3 tamponnée au véronal conseillée par Mayer et ses collaborateurs [1] donne satisfaction. Nous la préparons sans addition de calcium, mais la présence d'ions Mg^{++} , à la concentration optima donnée par ces auteurs [1], assurant la plus forte activité hémolytique et n'ayant par ailleurs montré aucun effet sensible sur la conservation du complément, nous faisons usage habituellement d'eau physiologique additionnée de $1,5 \times 10^{-4}$ M de Cl_2Mg .

4° *Complément.* — Nos recherches ont porté sur le complément de cobaye et, dans certains cas, sur le complément humain. Les sérums frais de cobaye utilisés comme source de complément sont des mélanges provenant de 25 à 100 animaux ; ils sont prélevés dans les conditions optima classiques. La conservation courte en est assurée à -25° mais pour des recherches comparatives devant durer plusieurs jours, le sérum est réparti en ampoules de Pyrex sous le volume de 1 cm^3 et congelé en couche mince à -70° , puis, après scellage des ampoules, conservé à cette température. Dans ces conditions, l'activité hémolytique et aussi la sensibilité à la destruction spontanée restent absolument fixes pendant plusieurs semaines.

Le complément humain provient de sujets en bonne santé de groupe O.

Toutes les manipulations portant sur le complément, pour la préparation des expériences, ont été effectuées dans la chambre froide à 2° avec des liquides préalablement refroidis à cette température.

5° *Globules rouges.* — Nous avons observé que la résistance des globules doit être aussi constante que possible car, pour une raison inconnue, non seulement l'activité hémolytique d'un complément donné varie suivant les globules employés, mais il en est de même, quoique dans une mesure moindre, pour la marche de la disparition apparente de cette activité. En d'autres termes la durée de la demi-vie d'un complément donné peut différer suivant les globules qui ont servi à la déterminer. Pour des mesures strictement comparatives, la standardisation des globules doit donc être rigoureuse. Après des essais variés, la meilleure méthode nous a paru consister à n'utiliser que des globules du jour qui peuvent même provenir avec avantage d'un seul mouton en bonne santé, très vigoureux et bien nourri. L'expérience prouve qu'il est

possible de prélever chaque jour, à un animal, 40 à 50 cm³ de sang, le sujet conservant un nombre constant de globules rouges et blancs mesurés à l'hématimètre et une résistance globulaire absolument fixe. Le sang recueilli sur anticoagulant est centrifugé à froid et les globules lavés à trois reprises avec de l'eau physiologique tamponnée froide. Les lavages terminés, on prépare immédiatement la suspension standardisée de globules par mesures photométriques suivant la technique exposée par P. Roulier [9] ; cette suspension, utilisée dans la journée, est conservée à 2°.

6° *Sérum hémolytique.* — Il est essentiel que ce réactif ait un titre élevé et soit dépourvu de pouvoir agglutinant notable. Nous utilisons un mélange de sérums de lapins fortement immunisés contre les hématies de mouton et titré suivant la technique de P. Roulier [9]. Le même sérum (n° 186) a servi dans toutes les expériences, son activité s'est maintenue parfaitement fixe.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION D'HÉMOLYSE. — C'est également celle de P. Roulier, néanmoins deux modifications ont dû être apportées. D'une part, la suspension de globules est préparée plus concentrée pour pouvoir évaluer une gamme étendue d'activités hémolytiques, ce qui nous a obligés à avoir recours à un autre photocolorimètre que celui de Bonét-Maury utilisé par P. Roulier et dont l'échelle de graduation est insuffisante pour les suspensions concentrées ; l'appareil employé est le photomètre de Vernes, Bricq et Constant, avec la cellule photo-électrique au césium et l'écran bleu vert B. G. ; la précision, la simplicité et la rapidité de manœuvre de ce photomètre ont facilité beaucoup ces recherches (1). La seconde modification apportée à la technique de Roulier est l'usage de papier log-probits pour tracer la courbe d'hémolyse représentant les variations du pourcentage des globules lysés en fonction de la concentration du complément (suivant l'équation de von Krog [40]) ; sur ce papier on obtient une droite [41, 42], facile à tracer et qui permet aisément en s'y reportant de suivre la baisse d'activité du complément.

Le *titrage du complément* permettant de tracer la droite d'hémolyse s'effectue avec une dilution à 1/50 en eau salée tamponnée de sérum de cobaye ou à 1/15 de sérum humain. Répartir la dilution du sérum dans 10 tubes aux doses de 0,05, 0,10, 0,15, ..., 0,50 cm³, compléter le volume à 2 cm³ dans tous les tubes avec de l'eau physiologique tamponnée. Ajouter partout 1 cm³ de suspension de globules sensibilisés obtenue en mélangeant, dix minutes auparavant, deux volumes égaux de sérum hémolytique dilué titré et de suspension globulaire. Ce réactif est préparé de la façon suivante : 13 cm³ de culot de globules sont dilués dans 150 cm³ d'eau physiologique, ajuster en suivant les indications données par P. Roulier, mais de façon que le taux de 50 p. 100 d'hémolyse donne une intensité optique de 150 au photomètre de Vernes (pour cela hémolyser 0,50 cm³ de la suspension dans 5,50 cm³ d'eau distillée, noter la densité optique et ajouter autant de centimètres cubes d'eau

(1) A la fin du temps d'hémolyse, les tubes sont retirés du bain-marie et plongés immédiatement dans la cuve à 0°, puis centrifugés à froid. On procède rapidement à la lecture au photomètre.

physiologique que le nombre trouvé dépasse 150 en unités. La suspension standardisée contient 2×10^9 globules par centimètre cube. Le sérum hémolytique est dilué au taux de 1/600 qui assure dans $0,50 \text{ cm}^3$ la présence de 2 unités hémolytiques pour le même volume de la suspension globulaire (technique de titrage du sérum hémolytique de P. Roulier [9] mais effectuée avec la suspension globulaire à 2×10^9 par centimètre cube). Après un séjour de quarante-cinq minutes au bain-marie à 37° , pendant lequel on agite souvent les portoirs, les tubes de titrage sont centrifugés à froid et la densité optique des liquides décantés est mesurée au photomètre. Les nombres obtenus divisés par 3 (l'hémolyse 50 p. 100 donnant l'indice 150 au photomètre) sont portés sur l'axe des ordonnées gradué en probits du papier spécial ; l'échelle indiquée sur l'axe des abscisses est logarithmique, on y porte les doses de complément. Il est alors toujours facile de tracer la droite passant par tous les points définis par les coordonnées obtenues car, si la technique suivie a été rigoureuse, il n'existe pas de points aberrants, sauf parfois pour les tout premiers tubes dans lesquels l'hémolyse est à peine ébauchée.

PRÉPARATION ET TITRAGE DU COMPLÉMENT DÉCALCIFIÉ. — Il est connu depuis longtemps, et les recherches récentes l'ont confirmé, que l'enlèvement de tout le calcium du sérum de cobaye ne paraît pas compatible avec le maintien de son activité complémentaire [3], mais que, par contre, une décalcification partielle, même très poussée (95 p. 100) ne portant que sur le calcium dialysable [43], laisse cette activité à peu près intacte [44, 45]. Pour éliminer la presque totalité du calcium sérique sans nuire au complément, deux procédés sont couramment utilisés : passages répétés sur de la résine échangeuse d'ions (« amberlite I R C 50 » de Rohm et Haas en cycle Na [46, 3]) ou la méthode plus ancienne de précipitation du calcium à l'état d'oxalate [45]. C'est cette dernière que nous avons adoptée : $0,05 \text{ cm}^3$, mesurés exactement, d'une solution à 4 p. 100 d'oxalate neutre de potassium R. P., pour analyses, sont ajoutés à chaque centimètre cube de sérum de cobaye. Maintenir dix minutes à la température du laboratoire, puis porter le mélange à la glacière pendant quatre à cinq heures, centrifuger à froid pour séparer le sérum clair du précipité d'oxalate de calcium. Après ce traitement, et par addition d'un excès d'oxalate, le sérum ne donne plus de trouble sensible au photomètre de Vernes (2). A noter que la baisse d'activité hémolytique qui suit ce traitement n'excède jamais 5 p. 100, ainsi qu'on le constate par un titrage comparatif effectué comme pour le sérum non décalcifié ; ce titrage donne, sur papier log-probits, une droite ayant constamment la même pente qu'avant l'action de l'oxalate, preuve que le complément n'est pas modifié. Toutes les expériences ultérieures étant faites,

(2) Nous procédions d'abord en déterminant au préalable la dose exacte de la solution d'oxalate de potassium à ajouter à 1 cm^3 de sérum mais en raison sans doute du nombre élevé de sérums individuels contenus dans chaque lot de complément le volume trouvé était toujours très voisin de $0,05 \text{ cm}^3$. C'est finalement cette dose qui a été choisie une fois pour toutes.

comme il a été dit, avec de l'eau contenant la concentration optimale de Cl_2Mg , on évite de cette manière toute baisse d'activité hémolytique par entraînement éventuel de magnésium dans le précipité d'oxalate de calcium.

PRÉPARATION ET TITRAGE DES FRACTIONS DU COMPLÉMENT : CHAÎNON MOYEN, CHAÎNON TERMINAL ET COMPLÉMENT PRIVÉ DU TROISIÈME COMPOSANT. — La technique de Pillemer par la méthode de dilution [47, 48] pour la séparation du chaînon moyen (contenant le premier composant) et du chaînon terminal (où se trouve le deuxième composant, ainsi que celle qui est conseillée par Kabat [49] pour le procédé par dialyse, nous ont toujours donné d'excellents résultats. Pour obtenir des fractions privées de calcium libre, la dialyse peut suffire, mais il vaut mieux utiliser du sérum déjà décalcifié par l'oxalate. L'établissement (avec un complément séparé en ses deux fractions) de la droite d'hémolyse servant de référence est ainsi obtenu : chaque fraction est diluée à 1/50 en se référant au volume initial du sérum (il faut donc mélanger un volume de chacune de ces dilutions pour reconstituer un volume du sérum initial à 1/50). La fraction I (contenant le premier composant) est distribuée dans les 10 tubes de titrage, comme il est indiqué pour le sérum normal (de 0,05 à 0,50 cm^3), on complète partout à 1,50 cm^3 puis on ajoute 1 cm^3 de globules sensibilisés. On laisse en contact dix minutes à 37° (3) puis le portoir est retiré du bain-marie et on distribue aux mêmes doses la dilution du chaînon terminal (deuxième composant), compléter enfin à 3 cm^3 et terminer le titrage comme pour le sérum non fractionné. On peut ainsi apprécier la perte d'activité qui est d'environ 20 p. 100 en moyenne ; comme pour le sérum décalcifié la pente de la droite n'est pas modifiée.

La meilleure technique pour priver un complément humain ou de cobaye du troisième composant nous paraît être celle de Pillemer et Ecker [20] par adsorption sur du zymosan, extrait de levure que nous préparons suivant la méthode indiquée par ces auteurs (4). La préparation utilisée dans ces expériences enlève totalement le troisième composant de tous les échantillons de sérum humain en traitant une heure à 37° chaque centimètre cube du complément par 1,3 mg de zymosan. Pour le sérum de cobaye, la dose doit être portée à 13,5 mg et le temps d'action à une heure et demie à 37°. Le titrage de référence du complément traité par le zymosan s'effectue comme pour le sérum initial, mais le pouvoir hémolytique doit être rétabli par addition dans chacun des tubes de titrage d'un volume convenable de sérum de cobaye inactivé à 54° pendant trente minutes. Pour cela

(3) La raison pour laquelle le chaînon moyen est laissé dix minutes à 37° après avoir été ajouté aux globules sensibilisés et avant que le chaînon terminal ne soit apporté à son tour est que ce procédé nous a seul permis d'obtenir des résultats réguliers lorsque nous étudions l'inactivation progressive du chaînon moyen séparé.

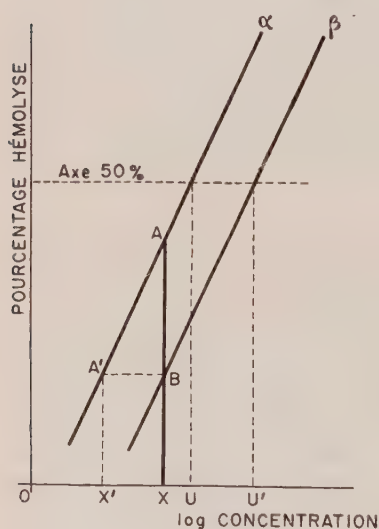
(4) Le zymosan est conservé à l'état lyophilisé en couche mince dans des ampoules de Pyrex contenant 10 mg de produit sec.

le complément à titrer dilué à 1/25 est additionné d'un volume égal de sérum inactivé dilué à 1/12,5 et le mélange distribué aux doses habituelles de 0,05 à 0,50 cm³. Perte moyenne de l'activité hémolytique initiale de l'ordre de 30 p. 100.

Résultat des expériences.

1° CYNÉTIQUE DE L'INACTIVATION SPONTANÉE A 37° DU COMPLÉMENT DILUÉ AVEC DE L'EAU PHYSIOLOGIQUE PURE, (TAMPONNÉE ET ADDITIONNÉE DE Cl₂Mg).

Afin d'étudier l'influence des différents facteurs pouvant modifier la destruction spontanée du complément, il convient en premier lieu de connaître avec précision la marche du phénomène lorsqu'on se place dans des conditions de base bien déterminées. L'influence du degré de dilution étant très marquée, on doit avant tout faire choix d'un taux fixe servant de référence. Pour des raisons qui seront exposées dans la suite, nous avons pris



pour le complément de cobaye le taux de 1/280. Une dilution à ce titre, en eau physiologique de base, d'un sérum frais de cobaye dont l'activité complémentaire a été déterminée par titrage, est répartie dans la chambre froide à 2°, dans une série de tubes sous le volume constant de 2 cm³ puis portée dans un bain-marie exactement réglé à 37°. Après chacun des intervalles de temps indiqués en abscisse sur la figure 1, on ajoute 1 cm³ de globules sensibilisés dans deux tubes (5) et après un temps d'hémolyse de quarante-cinq minutes la densité optique du surnageant centrifugé et décanté est lue au photomètre. Une fois tous

les résultats connus et en prenant pour base le pourcentage d'hémolyse dans les deux tubes du temps 0, on calcule quelle est la proportion de complément resté actif à chaque niveau de l'échelle des temps. Il suffit pour cela de se reporter à la droite

(5) Les mesures ont été exécutées en double dans toutes les expériences.

représentant sur papier log-probits le titrage préparatoire du complément.

L'évaluation précise de la baisse d'activité du complément doit en réalité être faite en comparant les quantités de ce réactif qui contiennent une unité 50 p. 100 d'hémolyse avant et après le processus d'inactivation partielle que l'on veut mesurer. Grâce à la transformation linéaire de la courbe d'hémolyse, il devient possible dans le cas présent d'éviter de calculer ces unités. Soit, en effet, les deux droites α et β obtenues par titrage du complément avant et après l'inactivation. Le raisonnement montre et l'expérience vérifie que dans les conditions où nous opérons ces droites sont parallèles. On voit sur le schéma qu'une concentration en complément de log OX donnant au temps 0 un pourcentage d'hémolyse de AX (mesuré en probits) ne donne plus au temps t après inactivation partielle qu'un pourcentage de BX (B étant situé sur la droite β) qui reporté sur α représente une concentration de complément resté actif dont le log est OX'. Les unités 50 p. 100 déterminées par les droites α et β étant les concentrations de log OU et OU', on voit que $X'X = UU'$, ce qui en raison de l'échelle logarithmique signifie que :

$$\frac{\text{concentration au temps } t}{\text{concentration au temps 0}} = \frac{\text{unité 50 p. 100 au temps 0}}{\text{unité 50 p. 100 au temps } t}$$

le rapport des concentrations en complément actif — après et avant l'inactivation partielle — mesurées sur la droite α d'après les pourcentages d'hémolyse aux temps t et 0 est égal à l'inverse du rapport des unités 50 p. 100 correspondantes.

Les logarithmes des nombres mesurant les baisses d'action sont portés en ordonnées et les temps correspondants en abscisse ; on peut alors tracer la courbe figurant le développement de l'inactivation spontanée du complément dans les conditions données. On voit que dans la première partie les points en sont sensiblement en ligne droite. Un grand nombre de tracés de courbes de disparition progressive et plus ou moins rapide de l'activité complémentaire des sérums, tracés obtenus dans des conditions variables, nous a montré qu'il s'agit là d'une règle générale : pendant la première partie du temps où elle se poursuit, les facteurs physico-chimiques ne variant pas, l'inactivation spontanée possède à chaque instant une vitesse proportionnelle à la concentration du complément resté actif dans la dilution. Cela découle de l'existence d'une relation linéaire entre le temps et le logarithme de cette concentration. A vrai dire, pendant les toutes premières minutes de l'atténuation progressive du complément, la courbe peut s'écarter légèrement de la ligne droite, et cela dans un sens ou dans l'autre (destruction plus lente ou plus rapide). Lorsque la destruction est avancée, dépassant 55 à 60 p. 100 en moyenne, le processus se ralentit : la courbe

s'infléchit et, perdant la forme linéaire, tend vers celle d'une hyperbole. Néanmoins, grâce à l'existence de la partie rectiligne de la courbe, on peut caractériser la marche du phénomène par le nombre qui exprime la durée de la demi-vie (c'est une constante pendant toute cette période).

La demi-vie d'un complément de cobaye, déterminée dans les conditions indiquées (dilution à 1/280 en eau physiologique de base exempte de calcium, température de 37°, globules frais de résistance normale), a une durée qui varie suivant les échantillons entre des limites qui s'écartent peu, dans la plupart des cas, du temps moyen de soixante-quinze minutes (durées extrêmes :

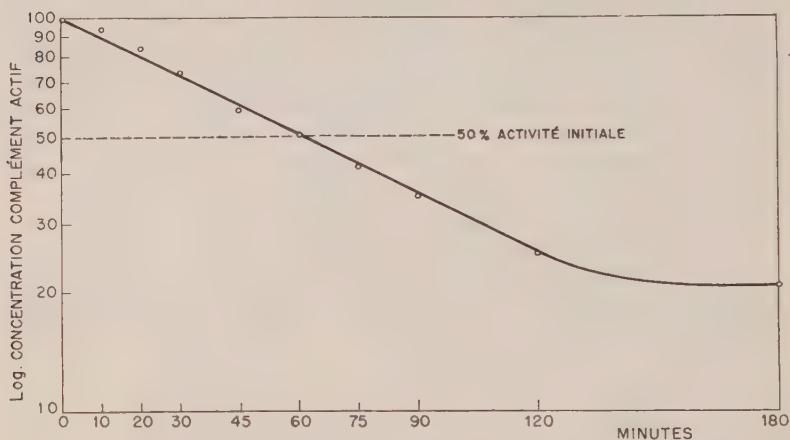


FIG. 1. — Courbe d'inactivation progressive à 37° d'un complément de cobaye (Sérum frais dilué à 1/280). En abscisse : temps en minutes. En ordonnée : concentrations du complément actif exprimées, à l'échelle logarithmique, en fonction de la base 100 au temps 0.

observées : quarante et cent soixante-cinq minutes). Pour un même lot de sérums, la conservation à -25° , même limitée à quelques jours, ou encore la lyophilisation abaisse souvent la demi-vie à soixante minutes et au-dessous ; par contre, les sérums congelés en couche mince à -70° , en ampoules Pyrex scellées, et conservés à cette température, ont, dans la règle, une demi-vie inchangée pendant plusieurs semaines.

Influence du taux de dilution du complément. — En procédant comme dans l'expérience précédente, nous avons étudié l'influence du taux de dilution du complément en eau physiologique sur la marche de l'inactivation. Pour cela, du sérum de cobaye a servi à préparer une série de dilutions en progression

géométrique de raison $1/2$ allant de $1/17,5$ à $1/280$. Un volume fixe exactement mesuré de chaque dilution est versé dans des tubes à hémolyse identiques qui sont portés au bain-marie à 37° . A la fin de chaque intervalle de temps, on retire un tube de toutes les dilutions, l'ensemble de ces tubes est rapidement refroidi dans un bain à 2° . On procède alors pour chacun des tubes (sauf celui de $1/280$) à une correction appropriée par addition d'eau physiologique froide de façon à ramener partout le taux de dilution à $1/280$. Pour cela, le contenu de chacun des tubes à rectifier est dilué dans un bécher avec le volume nécessaire d'eau physiologique froide (rincer le tube à plusieurs reprises). 2 cm^3 de chacune des dilutions, toutes ainsi ramenées au titre de $1/280$, sont alors répartis dans deux tubes et l'on ajoute partout 1 cm^3 de la suspension de globules sensibilisés. On procède pour l'hémolyse et la lecture des résultats comme dans l'expérience précédente. Les nombres trouvés sont rapportés dans le tableau I. On constate que l'atténuation progressive de l'activité hémolytique d'un sérum frais maintenu à 37° , s'opère très lentement dans les tubes où le complément est peu dilué, mais que le processus s'accélère brusquement dès que la dilution a atteint un niveau compris entre $1/70$ et $1/140$. A partir de $1/280$ environ la vitesse d'inactivation cesse pratiquement d'être sensible à l'accroissement du taux de dilution. Tout se passe comme si une action de freinage de la destruction se manifestait dans les sérums peu dilués, puis s'annulait rapidement dès que la dilution est assez forte. Cette

TABLEAU I. — Influence du taux de dilution sur la conservation, à 37° , du complément normal et décalcifié.

TEMPS DE SÉJOUR à 37° (en minutes)	POURCENTAGES DE BAISSÉ D'ACTIVITÉ										
	Sérum normal					Sérum décalcifié					
	Taux des dilutions soumises à l'inactivation (*)					Taux des dilutions soumises à l'inactivation (*)					
	1/280	1/140	1/70	1/35	1/17,5	1/280	1/140	1/70	1/35	1/17,5	1 17,5 + Cl ₂ Ca 1,5 × 10 ⁻⁴ M
0 . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 . . .	12	7	5	4	5	24	15	13	13	14	4
30 . . .	25	13	5	4	5	31,5	30	31	29	26,5	4
45 . . .	34	19	6	4	5	33	38	34,5	33	31	4
60 . . .	43	24	7	5	6	42	44	38	38	37	5
75 . . .	49	29	8	6	7	47,5	49	42,5	42	44,5	5
90 . . .	52	34	9	7	8	52	54	49	48,5	47,5	6
120 . . .	54	38	10	7	9	54	55	50	50,5	51	7

(*) Les dilutions sont toutes ramenées au taux de $1/280$ à la fin de chaque temps, immédiatement avant l'addition des globules sensibilisés.

hypothèse est confirmée par la suite des expériences ; l'agent protecteur est le calcium sérique comme on peut le voir sur le tableau I. Du sérum de même provenance, mais préalablement décalcifié suivant la technique déjà indiquée, perd sensiblement aussi vite à 37° son activité complémentaire lorsqu'il est plus ou moins dilué. Au delà du taux moyen de 1/280 environ, les sérums normaux ou décalcifiés se comportent à peu près de la même façon ; en deçà de ce taux c'est l'inverse qui est constaté. Une preuve supplémentaire de l'action protectrice du calcium sérique est donnée par le fait que le sérum décomplémenté par un chauffage de trente minutes à 56° et qui, ajouté à dose convenable (0,05 cm³ dans chaque tube) ralentit d'une façon extrêmement nette la destruction d'un complément dilué à 1/280 (même schéma expérimental) perd totalement cette efficacité s'il est décalcifié avant ou après le chauffage (tableau II). On doit remarquer que l'action protectrice bien connue du sérum normal inactivé est attribuée généralement aux protéines qu'il contient. Cette hypothèse n'est pas fondée puisqu'une simple décalcification supprime tout effet protecteur, tandis que l'addition ultérieure de Cl₂Ca à concentration convenable ($1,5 \times 10^{-4}$ M) en rétablit l'intégralité (tableau II). Le sérum inactivé doit donc bien son action protectrice au calcium qu'il renferme.

TABLEAU II. — Action protectrice du sérum normal inactivé.

TEMPS de séjour à 37° (en minutes)	BAISSE D'ACTIVITÉ DU SÉRUM FRAIS DE COBAYE A 1/280 (en pourcentages)			
	Série témoin (sérum frais seul)	Sérum frais plus <i>sérum inactivé</i> , normal ou décalcifié ajouté à la concentration finale de 1/35		
		Normal	Décalcifié	Décalcifié + Cl ₂ Ca, $1,5 \times 10^{-4}$ M
0	0	0	0	0
15	9	3	16	3,5
30	20	8,5	25	8,5
45	30,5	15,5	38	11,5
60	39,5	18,5	43	13
75	47,5	21	49	15
90	53	23	51	17
120	62	25	68,5	18

2° ETUDE DÉTAILLÉE DE L'ACTION DES IONS CALCIUM SUR L'INACTIVATION SPONTANÉE DU COMPLÉMENT.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié les conditions dans lesquelles les ions calcium entravent la dispa-

rition de l'activité complémentaire des sérums. Pour cela les observations rapportées ci-dessus ont servi de base, c'est-à-dire que les résultats des expériences suivantes ont été comparés soit avec ceux fournis par le sérum préalablement décalcifié, soit avec ceux du même sérum non modifié mais suffisamment dilué pour que l'action du calcium libre qu'il apporte soit négligeable (c'est pourquoi le taux de 1/280 a été choisi comme répondant à cette condition tout en conservant un pouvoir hémolytique approprié à la technique que nous utilisons). Il semble d'ailleurs préférable, quand cela est possible, de prendre comme élément de référence des sérums non modifiés plutôt que ceux soumis à un traitement préalable pouvant introduire des causes d'erreur supplémentaires. On doit noter par ailleurs que le sérum suffisamment dilué de façon à annuler l'effet protecteur des ions Ca^{++} libres qu'il contient possède, ainsi que le sérum décalcifié, une activité hémolytique qui n'est pas sensiblement modifiée par addition de calcium ionisé dans l'eau physiologique (sauf parfois dans le sens d'une légère baisse immédiate, mais qui ne se développe pas dans la suite). Ainsi que la remarque a souvent déjà été faite, il semble qu'il y a toujours assez de calcium pour assurer l'hémolyse, mais il n'en est pas de même pour la bonne conservation de l'activité du complément.

Influence de la concentration en calcium. — Des essais nombreux effectués avec différents sérums de cobaye dilués dans de l'eau physiologique de base additionnée de quantités variables de Cl_2Ca (sel R. P., pour analyse, à 2 molécules d'eau) nous ont permis de déterminer la marge de concentration assurant la conservation la meilleure. A noter que la durée de la demi-vie étant spectaculairement augmentée en présence de sels de calcium (6) et dépassant couramment vingt-quatre heures devient alors un élément d'appréciation difficile à déterminer avec précision. Il nous a paru, pour cette raison, suffisant de nous en tenir à des comparaisons de graphiques représentant la marche de la dénaturation pendant les deux premières heures de séjour à 37°. Ces comparaisons étaient faites en prenant pour base, ainsi qu'il vient d'être dit, la marche de l'inactivation à 37° du sérum dilué à 1/280 dans l'eau de base sans calcium. Il a été constaté dans ces conditions que l'action protectrice du calcium commence à devenir sensible avec la concentration très basse de 10^{-6} M de Cl_2Ca . Elle s'accroît ensuite rapidement et atteint son plafond entre les concentrations de 1×10^{-4} M et $1,5 \times 10^{-3}$ M,

(6) Pour déterminer la demi-vie dans ces conditions, il est utile d'ajouter des antibiotiques dans les tubes afin d'éviter toute pullulation microbienne pendant le séjour prolongé à 37°. La technique en sera indiquée dans la suite.

c'est-à-dire entre des limites assez rapprochées. A partir de $2,5 \times 10^{-3}$ M l'action protectrice s'affaiblit et fait place progressivement à l'effet inverse qui est déjà très marqué, même au temps 0, pour $1,5 \times 10^{-2}$ M. La concentration optima que nous avons adoptée à la suite de ces expériences est celle de $1,5 \times 10^{-4}$ M de Cl_2Ca (1 p. 1 000 d'une solution à 2,32 p. 100 de Cl_2Ca , 2 H_2O ajouté à l'eau physiologique de base). C'est aussi celle qui a été déterminée par Mayer et ses collaborateurs comme assurant l'activité hémolytique maxima et que de nombreux chercheurs ont ensuite adoptée [4].

Action réversible des ions calcium. — Nous avons constaté que les ions Ca^{++} ajoutés à concentration optima dans une solution de complément partiellement inactivée par un séjour à 37° provoquent un retour vers le pouvoir hémolytique initial, ainsi qu'il ressort de la lecture du tableau III. Ces expériences ont été conduites en préparant plusieurs séries de tubes contenant tous 2 cm^3 de sérum décalcifié de cobaye dilué à 1/200 ; une série sert

TABLEAU III. — Action réversible de Ca^{++} .

TEMPS de séjour préalable à 37° (en mn)	BAISSE D'ACTIVITÉ EN POURCENTAGES du sérum frais décalcifié de cobaye (dilué à 1/200)				
	SÉRIE témoin	Séries avec Cl_2Ca (concentration finale : $2,25 \times 10^{-4}$ M) ajouté après des temps de			
		0 mn	30 mn	60 mn	120 mn
30	49	15 (21)	10 (47)	10 (47)	10 (47)
60	32	23 (28)	11 (65)	10,5 (67)	10,5 (67)
90	45	25 (44)	11 (75)	11 (75)	10 (77)
120	55,5	28 (48)	11,5 (79)	11 (80)	11 (80)
180	60	30 (50)	11,5 (81)	11 (81)	11 (81)

Les nombres en italique et entre parenthèses représentent les proportions de complément réactivé par Ca^{++} .

de témoin, les autres reçoivent à la fin de chacun des temps de séjour à 37° 1 goutte par tube d'une solution à 9×10^{-4} M de Cl_2Ca , ce qui rétablit une concentration optima en ions Ca^{++} , puis les globules sensibilisés sont ajoutés soit tout de suite après l'apport de calcium, soit après des temps échelonnés de zéro à cent vingt minutes. Il apparaît très nettement à la lecture des résultats que l'addition secondaire de la dose optima de calcium rétablit une partie très importante de l'activité complémentaire qui avait disparu et cela dans une proportion qui, pour un

complément ayant déjà atteint la demi-vie, peut dépasser 90 p. 100 de l'activité perdue. Se manifestant rapidement, puisqu'elle est déjà très sensible lorsque la dose correctrice de Cl_2Ca est apportée immédiatement avant les globules sensibilisés, l'action réversible du calcium se renforce lentement si l'on prolonge l'intervalle entre l'addition de calcium et celle des globules ; elle semble atteindre son maximum, dans les conditions de l'expérience après une demi-heure à 37° .

Spécificité de l'action des ions calcium. Action opposée du cuivre. — Des essais de remplacement du calcium par d'autres cations divalents et aussi par des monovalents ont mis en évidence le caractère nettement spécifique de l'action protectrice du calcium, en ce sens que si d'autres cations, à concentration convenable, agissent dans le même sens, leur effet est toujours très faible, infiniment moins marqué que celui du calcium. Ont été essayés par addition à l'eau physiologique de base, en suivant la même technique que pour le calcium, les ions : K^+ , Li^+ , Mg^{++} (ces derniers bien entendu dans une eau de base n'en contenant pas), Ba^{++} , Sr^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , tous apportés à l'état de chlorure ou de sulfate (Fe, Ni). Sauf pour le chlorure de potassium dont la concentration optima se situe autour de 3×10^{-3} M, les sels des autres métaux étaient pris à partir de 1×10^{-4} M, en faisant varier leur concentration dans les deux sens. Pour tous il est possible, comme avec le calcium, de trouver des concentrations limites plus ou moins nettes : une supérieure où le sel étudié commence à entraver nettement l'hémolyse au temps 0 et une inférieure où toute action s'annule ; sauf pour le potassium ces limites sont plus rapprochées que celles du calcium. Ces expériences nous ont montré que les cations essayés peuvent être classés en trois catégories : ceux qui à concentration convenable agissent dans le même sens que le calcium mais d'une façon incomparablement moins marquée ; sont dans ce cas : K^+ , Li^+ , Co^{++} ; ceux qui paraissent réellement neutres en deçà de la concentration où commence à s'exercer un effet de blocage de l'hémolyse, il en est ainsi pour les cations apportés par le sulfate ferreux, le sulfate de nickel, les chlorures de baryum et de strontium. Le magnésium se range aussi dans cette deuxième catégorie, ce qui contraste avec sa remarquable action activante de l'hémolyse. Enfin il existe une dernière classe d'ions constituée par ceux dont l'action est nettement inverse de celle du calcium, c'est-à-dire qui, en deçà des concentrations anti-hémolytiques, accélèrent nettement l'inactivation spontanée du complément maintenu à 37° : c'est le cas du zinc et surtout du cuivre. L'action de ce dernier métal doit retenir l'attention non seulement par son intensité mais également par ses conséquences pratiques car des traces de cuivre, très

actives du point de vue qui nous occupe, sont souvent présentes dans l'eau distillée des laboratoires. La figure 2 illustre l'action des ions Cu^{++} . Nulle au temps 0 avec les concentrations choisies, cette action se manifeste par une accélération de la destruction du complément à 37° . On voit en effet que dans les mêmes conditions de l'expérience I (fig. 2) la pente de la droite est d'autant plus forte que la concentration est plus élevée. Quant à l'action protectrice des ions Ca^{++} , elle existe aussi lorsque Cu^{++} est présent,

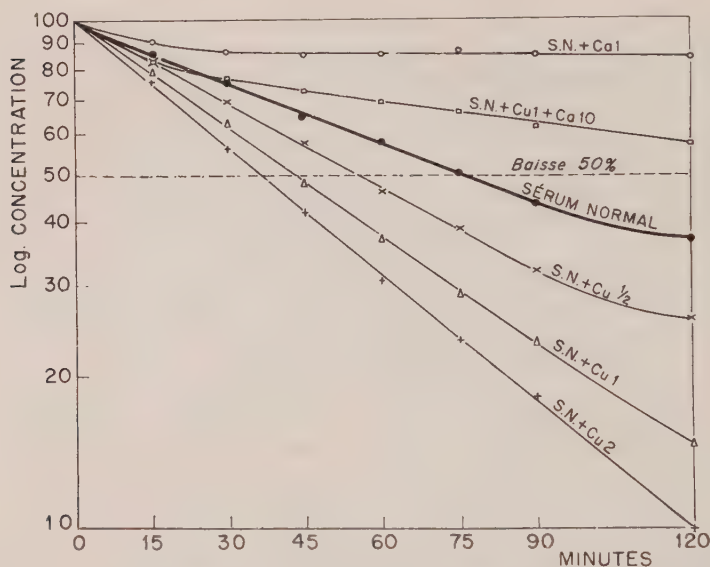


FIG. 2. — Action favorisante des ions Cu^{++} sur le phénomène d'inactivation à 37° d'un complément de cobaye dilué à $1/280$. Action antagoniste de Ca^{++} . (La courbe SN + Cu 1 se rapporte à la dilution du complément en eau physiologique de base contenant 2×10^{-5} M de SO_4Cu , les courbes S. N. + Cu $1/2$ et S. N. + Cu 2 à des dilutions ayant une teneur en cuivre égale à la moitié ou au double de celle de la dilution Cu 1. De même Ca 1 représente une concentration de $1,5 \times 10^{-4}$ M de Cl_2Ca et Ca 10 une teneur en Ca dix fois plus forte.)

mais avec une intensité qui varie en sens inverse de la concentration en ions nocifs. En d'autres termes, ces deux sortes de cations divalents Ca^{++} et Cu^{++} ont des actions nettement antagonistes (7).

(7) L'existence de cet antagonisme marqué nous avait d'abord fait croire que l'action protectrice du calcium ne pouvait se manifester en présence de cuivre. Il n'en était rien, comme la figure 2 le montre, mais pour que l'addition de calcium agisse il faut en élever la teneur au-dessus de celle qui suffit à protéger un sérum sans cuivre.

3° COMPORTEMENT DES COMPOSANTS DU COMPLÉMENT AU COURS DE L'INACTIVATION A 37°.

Les quatre composants connus du complément ayant une sensibilité thermique différente (on sait que les troisième et quatrième composants, dits thermo-stables, résistent assez bien à la température de 56° qui détruit rapidement les premier et deuxième composants), il est à présumer que tous ne subissent pas également l'inactivation spontanée à 37°, qui atteint l'action hémolytique du complément tout entier en l'absence d'une concentration suffisante en calcium.

Tout d'abord on peut écarter l'hypothèse, assez improbable *a priori*, que les composants stables à 56° pourraient être affaiblis en quelques minutes à 37°, comme c'est le cas en l'absence de calcium. Il a déjà été vu, en effet, que du sérum ayant subi une décalcification avant ou après avoir été chauffé à 56° a perdu la propriété de modifier le processus d'inactivation du complément auquel on l'ajoute ; or le sérum ainsi traité contient encore les deux composants thermo-stables. Malgré la présence d'un excès de ces deux facteurs apportés par le sérum chauffé décalcifié, la marche de l'inactivation reste inchangée, ce qui semble bien indiquer qu'ils ne participent pas au phénomène. Une autre preuve qu'il en est bien ainsi est que du sérum privé seulement du troisième composant par le zymosan (voir techniques) ou du quatrième par l'hydrazine (la technique étant celle de Pillemer [21]) et soumis ensuite à l'inactivation à 37° après dilution à 1/280 se comporte exactement comme le sérum initial si on lui restitue le composant enlevé en ajoutant dans les tubes, à la fin de chacun des temps échelonnés, 0,10 de sérum décalcifié de cobaye à 1/5 préalablement chauffé à 56°.

Reste le cas des deux composants thermo-labiles. Pour connaître leur comportement, nous les avons étudiés séparément en préparant, comme il a été dit, les deux fractions du complément de cobaye dénommées chaînon moyen et chaînon terminal. Chacune de ces deux fractions diluées à 1/100 (par rapport au volume initial du sérum) a été répartie à la dose uniforme de 1 cm³ dans des tubes portés ensuite à 37°. On soumettait ainsi à l'inactivation deux séries ne contenant chacune qu'une seule des deux fractions du complément. Les restes non répartis des deux dilutions étaient conservés à part à 0° afin de permettre d'ajouter la fraction manquante dans les tubes de chaque série, après les séjours échelonnés à 37°. Suivant une technique identique à celle déjà indiquée pour le titrage d'un complément séparé en ses deux chaînons, l'addition de la fraction manquante était précédée de dix minutes par l'apport dans les tubes de 1 cm³ de globules sensibilisés. La lecture des résultats effectuée après le temps habituel d'hémolyse

est rapportée dans le tableau IV. On voit nettement, et d'autres expériences de même type nous l'ont pleinement confirmé dans la suite, que seule la série contenant au premier temps la fraction dite chaînon moyen où se trouve le premier composant est très sensible au processus d'inactivation à 37°, la résistance de la fraction dite chaînon terminal (contenant le deuxième composant) étant par contre considérable. Tout le problème est donc ramené en fin de compte à l'étude de l'inactivation spontanée du seul composant thermo-labile de nature euglobulinique. Nous avons constaté que c'est également envers ce composant que le calcium

TABLEAU IV. — Inactivation à 37° des deux fractions séparées du complément de cobaye (chaînon moyen et chaînon terminal).

TEMPS de séjour à 37° (en minutes)	BAISSE D'ACTIVITÉ EN POURCENTAGES			
	Chaînon moyen (1 ^{er} composant) Incubation préalable en eau physiologique de base :		Chaînon terminal (2 ^e composant) Incubation préalable en eau physiologique de base :	
	pure	+ SO ₄ Cu 10 ⁻⁵ M	pure	+ SO ₄ Cu 10 ⁻⁵ M
0	0	28	0	— 12 (*)
15	33	44,5	1	— 10
30	41,5	56	3	— 8
45	54	64,5	5	— 6
60	60	71,5	6	— 2
75	64,5	80	8,5	0
90	66,5	86	12,5	0
120	67	90	15	0

(*) Les nombres négatifs expriment l'augmentation d'activité due à l'action de Cu ++ sur le chaînon terminal séparé.

joue son rôle protecteur et le cuivre son action opposée ; il est remarquable que ce dernier métal n'est pas toxique pour le deuxième composant (au moins lorsque sa concentration est au-dessous de celle qui bloque l'hémolyse au temps 0), mais qu'il exerce même sur lui une action favorisante de l'hémolyse (tableau IV). Cet effet du cuivre sur le deuxième composant est encore plus net si le milieu ne contient pas assez de magnésium, les ions Cu⁺⁺ ont donc une action de même sens que celle des ions Mg⁺⁺, mais à l'inverse de ceux-ci, ils se montrent toxiques pour le premier composant.

On sait depuis longtemps, et des expériences récentes l'ont plus clairement établi [22, 23], qu'il est nécessaire que le chaînon moyen agisse sur les globules sensibilisés avant le chaînon terminal pour que l'hémolyse ait lieu. Comment se comporte le premier compo-

sant lorsqu'il est ainsi fixé sur des globules sensibilisés en l'absence du deuxième ? Pour le savoir, la suspension de globules sensibilisés a été mélangée, à volume égal (en opérant comme toujours sur des réactifs refroidis et répartis dans la chambre froide), avec une solution du chaînon moyen de complément de cobaye à 1/100, le mélange a été alors réparti dans deux séries de tubes (n^{os} 1 et 2) sous le volume constant de 2 cm³. Deux séries témoins (n^{os} 3 et 4) ne contenaient pas de globules mais seulement 1 cm³ de la dilution du chaînon moyen dans chaque tube. On ajoutait alors, toujours à froid, dans tous les tubes des séries 2 et 4, 0,05 cm³ d'une solution de SO₄Cu de titre calculé pour que la concentration ainsi réalisée en sel de cuivre soit de 2×10^{-5} M. Puis, après les temps échelonnés de séjour des quatre séries à 37°, l'expérience a été terminée comme ci-dessus pour les séries témoins (additions successives de globules et du chaînon terminal), et en ajoutant seulement 1 cm³ du chaînon terminal à 1/100 pour les séries 1 et 2. Les résultats rapportés dans le tableau V

TABLEAU V. — Inactivation du premier composant (chaînon moyen) fixé sur les globules sensibilisés.

TEMPS de séjour à 37° (en minutes)	BAISSE D'ACTIVITÉ EN POURCENTAGES			
	Chaînon moyen non fixé (séries témoins) en eau physiologique de base		Chaînon moyen fixé en eau physiologique de base	
	pure	+ SO ₄ Cu 2×10^{-5} M	pure	+ SO ₄ Cu 2×10^{-5} M
0	0	15	0	0
15	14	43,5	1,4	0
30	28,5	65	1,8	1,2
45	38,5	74,5	3,5	1,3
60	46,5	78	3,8	2
75	52	80	5	2,5
90	55	81,5	5,8	2,7
120	56	83	6,1	3

montrent clairement que le premier composant une fois fixé sur les globules sensibilisés n'est plus sujet à l'inactivation progressive rapide à 37° ni à l'action accélératrice que les ions Cu⁺⁺ exercent sur ce processus. Nous avons vérifié qu'il en est de même lorsque la température est plus élevée : à 45°, par exemple, on n'observe pas non plus de destruction du premier composant fixé, même après plusieurs heures ; cela contraste fortement avec les résultats obtenus à cette température élevée pour le même composant non fixé par les globules. Autrement dit, l'état d'instabilité à 37° du

premier composant dans les milieux ne contenant pas assez de calcium disparaît dès que ce facteur a été absorbé par les globules qui deviennent dès lors sensibles d'une *manière permanente*, à l'action ultérieure du chaînon terminal.

4° INACTIVATION DU COMPLÉMENT FIXÉ SUR LES GLOBULES SENSIBILISÉS.

Nous venons de voir que le premier composant, le seul sensible au phénomène d'inactivation à 37°, et qui est aussi celui que les globules sensibilisés fixent d'abord, devient stable à cette température et au-dessus lorsque la fixation s'est produite. En est-il de même lorsque le deuxième composant est à son tour fixé ? Les travaux de Pillemer, Heidelberger et leurs collaborateurs et ceux plus récents de Levine, Mayer *et al.* [17, 24, 23] ont établi que le troisième composant n'intervient pour déclencher l'hémolyse que lorsque les trois autres composants sont déjà fixés sur les globules ; ce phénomène fournit donc un moyen simple pour étudier quel est le sort de l'ensemble des facteurs 1, 2 et 4 du complément lorsqu'ils sont absorbés, en l'absence du troisième, par les globules sensibilisés. L'expérience a été conduite avec du sérum de cobaye et du sérum humain privés, comme il a été dit, du troisième composant, par l'action du zymosan. En opérant toujours à froid, une solution de titre à 1/100 de sérum de cobaye ou à 1/20 de sérum humain traités préalablement par le zymosan a été mélangée, à volume égal, avec une suspension de globules sensibilisés, puis le mélange réparti dans deux séries de tubes (2 cm³ par tube) était porté à 37°. Après des temps en série, on déclenchait l'hémolyse par addition de 1 cm³ de sérum de cobaye ayant été chauffé à 56° et dilué à 1/40, ce réactif apportant le troisième composant manquant. L'expérience terminée dans les conditions habituelles a montré (tableau VI) que, contrairement au résultat de l'expérience précédente, il se produit une inactivation rapide à 37° de l'ensemble des trois composants : premier, deuxième et quatrième fixés sur les globules. Nous avons observé, en outre, que le processus d'inactivation n'était pas dans ce cas entravé par le calcium, même en excès (dix fois la dose optima), ni même si l'on prenait soin de laisser séjourner les globules sensibilisés, pendant une heure à 37°, dans une solution enrichie en calcium (1 × 10⁻³ M de Cl₂Ca). L'intervention du deuxième composant sur les globules ayant déjà fixé le chaînon moyen rétablit donc, en l'accroissant, la sensibilité initiale à 37° du complément, et ce processus échappe à l'action protectrice du calcium, comme d'ailleurs, ainsi que nous nous en sommes assurés, à celle opposée des ions Cu⁺⁺. Quel que soit l'effet : inhibition ou accélération, l'intervention des cations au cours du phénomène

TABLEAU VI. — Inactivation à 37° du complément privé du 3^e composant et fixé sur les globules sensibilisés.

TEMPS (en minutes)	BAISSE D'ACTIVITÉ EN POURCENTAGES dans l'eau physiologique de base	
	pure	+ Cl ₂ Ca (1,5 × 10 ⁻³ M)
0	0	0
5	10,5	11
10	19	20
15	27	29
20	34	36,5
25	40	42,5
30	46,5	47,5
35	52	54

d'inactivation progressive à 37° ne semble donc pouvoir se produire que sur le premier composant libre ; au stade de liaison globulaire ce facteur devient stable aussi longtemps que le deuxième n'intervient pas entraînant alors un retour de la sensibilité à 37°. Dans les deux cas les cations sont sans effet.

5° ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES VARIATIONS D'AUTRES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES : TEMPÉRATURE, CONCENTRATION SALINE, pH, SUR LE MÉCANISME D'INACTIVATION PROGRESSIVE DU COMPLÉMENT.

En possession des données précédentes, il devient plus aisé d'aborder l'étude de l'influence des autres conditions physiques.

a) INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — Toutes les expériences décrites jusqu'à présent ont été faites à 37° exactement. Pour poursuivre l'étude du phénomène, il était indiqué d'étudier l'effet des variations de température. Dans une série d'expériences, nous avons abandonné du complément de cobaye dilué à 1/280 au mécanisme d'inactivation spontanée à : 29°, 32°, 34°, 37° (série témoin), 45° et 50°. On déterminait, comme il a été dit, la durée de la demi-vie à chacune de ces températures. Nous avons constaté qu'à 29° et 32° la demi-vie est fort prolongée, ce qui nous a conduits, pour la déterminer sans qu'une pollution microbienne ne vienne modifier les conditions, à ajouter, comme il a déjà été dit, 50 unités de pénicilline et 5 µg de di-hydro-streptomycine par centimètre cube de la dilution du complément en eau physiologique de base. Nous nous étions d'abord assurés qu'à ces concentrations les antibiotiques utilisés ne modifient pas la marche du phénomène. La lecture du tableau VII montre la grande influence de la température. Très lente à 32° et au-dessus, l'inactivation acquiert rapide-

ment entre 32° et 34° une vitesse considérable qui s'accroît plus lentement quand la température continue à s'élever. Le même tableau révèle que les ions Ca^{++} jouent leur rôle protecteur à 34° et au-dessus mais paraissent sans effet aux températures inférieures. En réalité, il n'en est pas ainsi, car ainsi qu'on le voit sur le tableau VII, si la même expérience est faite avec du

TABLEAU VII. — Demi-vie à des températures variables du complément de cobaye dilué à 1/280.

(Les nombres expriment la durée de la demi-vie en minutes, sauf ceux marqués h. qui sont comptés en heures et ne sont d'ailleurs qu'approchés.)

NATURE DU COMPLÉMENT	TEMPÉRATURE D'INCUBATION					
	29°	32°	34°	37°	45°	50°
Normal	32 h.	45 h.	110	75	40	20
Décalcifié	120	90	60	60	20	10
Normal + Ca 1 *	40 h.	32 h.	24 h.	27 h.	100	60
Normal + Ca 10 *				27 h	300	100
Normal + Ca 20 *				23 h.	180	120

* + Ca 1 signifie que la dilution à 1/280 de complément normal a été faite en eau physiologique de base contenant $1,5 \times 10^{-4}$ M de Cl_2Ca . Ca 10 et Ca 20 représentent des concentrations 10 et 20 fois plus élevées en Cl_2Ca .

sérum préalablement décalcifié, la vitesse d'inactivation aux basses températures est beaucoup plus grande qu'avec le sérum non décalcifié. Comme, d'autre part, l'optimum de la concentration en calcium protégeant le complément se situe plus haut à 45° et 50° qu'à 37° (respectivement environ dix et vingt fois la concentration de $1,5 \times 10^{-4}$ M trouvée à 37°), on est en droit de conclure qu'il faut d'autant moins d'ions Ca^{++} pour prévenir l'inactivation du premier composant que la température est moins élevée ; c'est la raison pour laquelle du sérum dilué à 1/280 est sensible à 34° mais se montre au contraire très stable à 29°, le calcium libre apporté par le sérum dilué étant insuffisamment concentré pour protéger efficacement le complément à la plus élevée de ces températures, mais assez, à la plus basse.

b) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SALINE (FORCE IONIQUE) DU MILIEU. — Procédant toujours suivant une méthode identique, c'est-à-dire en maintenant fixes toutes les autres conditions, nous avons recherché l'effet des variations de la concentration en ClNa du milieu, par comparaison avec le phénomène observé à la concentration de base de 8,5 p. 1 000 (0,145 M). Le protocole expérimental

a été le suivant : une gamme d'eaux de concentration variable en ClNa, toutes tamponnées à pH 7,3, ont servi à préparer des séries de tubes (une par concentration) contenant chacun 0,25 cm³ d'une dilution à 1/25 — toujours par rapport au volume initial du sérum — du chaînon moyen d'un complément de cobaye (tableau VIII). Après les temps échelonnés de séjour à 37°, on rétablissait l'isotonicité (0,85 p. 100) par addition dans les tubes de chaque série de 0,75 cm³ d'eau tamponnée à concentration en sel convenable. L'expérience était ensuite terminée comme pour les précédentes de même ordre, c'est-à-dire en ajoutant partout 1 cm³ de la suspension de globules sensibilisés puis, dix minutes après, le même volume de chaînon terminal dilué à 1/100. Les résultats de l'expérience sont exposés dans le tableau VIII ; ils montrent que l'augmentation, même faible, de la teneur en ClNa au-dessus de

TABLEAU VIII. — Inactivation du chaînon moyen (1^{er} composant), à 37°, dans de l'eau à concentration variable en ClNa.

TEMPS (en minutes)	CONCENTRATION DE ClNa EN P. 1000 *							
	18	9,5	9	8,5	8	7	0 (**)	18 (***)
	MOLARITÉ							
	0,307	0,162	0,154	0,145	0,136	0,119	0 (**)	0,307 (***)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	59,5	31	28,5	20	15	8,5	3	10
60	66,5	52	48	36	29	17	6	13
90	68	63	59	50	39,5	24	8,5	15
120	69	66	62,5	56,5	50	31	9	17

* A la fin de chaque temps d'incubation et avant d'ajouter les globules sensibilisés, les dilutions du chaînon moyen en eaux de concentration saline variable étaient toutes ramenées à l'isotonicité (8,5 g de ClNa p. 1000).
 ** Eau distillée.
 *** Eau à 18 p. 1 000 de ClNa + $1,5 \times 10^{-3}$ M de Cl₂Ca.

l'isotonicité accélère d'une manière marquée le processus d'inactivation ; par contre, l'hypotonie du milieu le ralentit considérablement, la destruction devenant pratiquement nulle dans l'eau distillée. On voit aussi que les ions Ca⁺⁺ entravent l'inactivation dans de l'eau fortement salée (et malgré la toxicité de ces fortes concentrations pour le premier composant), comme ils le font en milieu isotonique. Cette observation explique pourquoi le complément pur ou très faiblement dilué peut garder son activité intacte lorsqu'il est en milieu hypertonique (procédé de conservation classique), la teneur en calcium du sérum étant

largement suffisante pour protéger le premier composant contre la dénaturation par le sel de sodium. Il n'en est évidemment pas de même lorsque le premier composant a été séparé dans le chaînon moyen et, par suite même des conditions de préparation, dépourvu de calcium protecteur. Notons en passant que ce sont bien les ions Na^+ qui à force ionique suffisante, et en l'absence d'une teneur adéquate en calcium, se montrent toxiques pour le premier composant, car les résultats sont tout à fait superposables lorsqu'on remplace ClNa par SO_4Na_2 , à molarité égale.

c) INFLUENCE DU pH. — Contrairement aux facteurs jusqu'ici étudiés le pH n'exerce qu'une influence relativement minime sur la marche de l'inactivation à 37° , au moins dans la gamme usuelle où les réactions biologiques sont en général possibles. Nos résultats ont montré que le pH optimum assurant la meilleure conservation se situe autour de la neutralité mais plutôt du côté alcalin [entre 7 et 7,3] (8). Aux pH acides le processus d'inactivation s'accélère faiblement et d'autant plus que l'on s'éloigne davantage de la neutralité : à pH 5,25 la demi-vie du chaînon moyen n'est diminuée que d'environ 50 p. 100. Du côté alcalin il en est de même, mais ce n'est qu'au-dessus de pH 9 que la destruction du premier composant devient très rapide, fait depuis longtemps connu puisque c'est là un obstacle à la préparation du quatrième composant par action de l'ammoniaque à 37° [12, 21]. Ajoutons que dans ces expériences, comme dans celles sur l'influence de la concentration saline, on avait soin de rétablir les conditions normales (de pH dans le cas présent) avant d'ajouter les autres réactifs (globules sensibilisés et chaînon terminal) ; on opérait pour cela par addition d'eau physiologique acide ou alcaline de façon à ramener le pH à 7,3.

Résumé. Considérations générales.

Des expériences qui viennent d'être rapportées il ressort que le phénomène d'inactivation rapide des propriétés hémolytiques du complément, dans les conditions où l'hémolyse est possible, porte seulement sur le premier composant, connu d'ailleurs depuis longtemps comme le plus instable [22, 25]. La marche de ce phénomène apparaît d'abord régulière, la vitesse en étant proportionnelle à chaque instant à la concentration du complément resté actif, mais, quand plus de la moitié de l'activité a disparu, on observe généralement un ralentissement de plus en plus marqué

(8) Les mesures de pH ont été prises à l'électrode de verre avec le potentiomètre de Meci, type VS. On a préparé la gamme d'eaux physiologiques de pH différent en mélangeant, en proportions variables, les solutions acides et alcalines de véronal en eau salée.

du processus d'inactivation. C'est là, on le voit, un caractère qui évoque l'allure d'une réaction enzymatique et l'intervention d'un ferment fut en effet notre première hypothèse pour expliquer le mécanisme du phénomène. Un autre caractère essentiel de l'inactivation spontanée du premier composant est qu'elle est très considérablement ralentie par la présence, dans le milieu, d'ions Ca^{++} à concentration convenable ; l'action protectrice exercée par ces ions apparaît spécifique car aucun autre cation divalent ou monovalent ne possède une propriété aussi marquée. A l'opposé, le processus d'inactivation est accéléré dans les conditions suivantes :

1° Si la température s'élève au-dessus de 37° ;

2° Si la concentration en ions Na^{+} est augmentée dans le milieu (bien entendu la diminution de la concentration saline ainsi que l'abaissement de la température ont l'effet inverse : baisse de la vitesse d'inactivation) ;

3° Lorsque certains cations divalents, se comportant comme antagonistes du calcium, sont présents, même en quantité extrêmement faible ; c'est le cas de Zn^{++} et surtout de Cu^{++} .

Il est alors apparu nécessaire d'analyser plus avant le rôle spécifique des ions Ca^{++} ; les faits suivants ont été établis :

1° Il existe une relation entre la concentration en ions Ca^{++} nécessaires pour prévenir l'inactivation et l'intensité des différents mécanismes tendant à accélérer le phénomène. Cela est particulièrement net pour l'influence de la température. A 29° par exemple, les traces véritablement infimes de calcium libre contenues dans une dilution de sérum à $1/280$ suffisent pour freiner la marche de la destruction du premier composant, mais ces traces deviennent insuffisantes dès que la température s'élève à 34° et, *a fortiori*, au-dessus. Il en est de même pour l'action accélératrice des ions Cu^{++} qui n'est entravée d'une manière sensible par le calcium que si la concentration des ions protecteurs est proportionnée à celle des ions antagonistes ; un phénomène identique est observé lorsque les ions Na^{+} atteignent une concentration élevée toxique dont l'effet est aussi annihilé par l'apport de calcium en quantité convenable.

2° L'action des ions calcium possède un caractère net de réversibilité. Nous avons vu que le premier composant peut exister dans un état encore instable d'inactivité pouvant, plus ou moins, faire retour vers l'état normal lorsque la concentration en calcium est rétablie dans le milieu à un niveau suffisant.

L'étude du mécanisme intime du phénomène d'inactivation du premier composant se poursuit, mais d'ores et déjà, les faits observés plaident pour l'existence d'une association étroite entre le premier composant et certains des ions divalents Ca^{++} existant dans le sérum. Que les molécules du premier composant établissent

à l'état normal, par l'intermédiaire de Ca^{++} , des liaisons fonctionnellement nécessaires soit entre elles, soit avec d'autres composés sériques, ou bien qu'elles constituent avec ces ions des complexes actifs dont la nature reste à déterminer, l'hypothèse la plus plausible est bien l'existence dans le sérum d'une forme naturelle de ces molécules dans laquelle les ions Ca^{++} jouent un rôle prédominant et exclusif. La dissociation des liaisons Ca — premier composant (cette expression étant prise dans un sens général) entraîne une disparition d'abord réversible puis définitive de l'activité biologique de ce facteur. Un tel phénomène de dissociation est peut-être, nous l'avons vu, sous la dépendance d'un enzyme, mais des faits comme l'action compétitive d'autres cations divalents tels Cu^{++} , le caractère réversible de l'effet du calcium, la nécessité d'un certain équilibre entre la concentration des ions protecteurs et l'intensité d'une action inverse, d'autres caractères encore, comme l'influence peu marquée des variations de pH, font plutôt pencher vers une autre explication. L'hypothèse serait que les ions Ca^{++} constitutifs des molécules normales du premier composant peuvent être déplacés par des ions antagonistes toutes les fois que l'équilibre physico-chimique entre eux et Ca^{++} est rompu en leur faveur. Il en est ainsi pour le sodium quand on dilue fortement le sérum dans de l'eau salée sans augmenter la concentration en calcium ; le déséquilibre en faveur de Na^+ étant accentué par l'élévation de la température ou de la force ionique. D'autres cations tels Cu^{++} sont dans le cas présent des agents beaucoup plus forts de déplacement du calcium, mais il est probable que le mécanisme de leur action n'est pas essentiellement différent de celui de Na^+ .

Un argument supplémentaire du bien fondé de cette hypothèse est que les causes qui perturbent l'équilibre des complexes supposés cessent de manifester leurs effets dès que les molécules du premier composant sont fixées par les globules sensibilisés et contractent, de ce fait, des liaisons nouvelles. Nous avons vu, en effet, que les globules ayant fixé le chaînon moyen seul (où se trouve tout le premier composant) restent indéfiniment sensibles à l'action du chaînon terminal qui permet seul au processus aboutissant à l'hémolyse de se poursuivre. Le même premier composant fixé échappe aussi à l'action de Cu^{++} ; c'est donc que dans cet état, qui n'entraîne d'ailleurs aucune effet apparent, il n'est plus identique à ce qu'il était à l'état libre dans le sérum. La stabilité du premier composant fixé contraste vivement avec l'instabilité accrue qui réapparaît lorsqu'on fait ensuite agir le deuxième et le quatrième composant. Ce dernier fait récemment mis en évidence par les importantes recherches de Levine et ses collaborateurs [23] a été vérifié, comme nous l'avons exposé, en soumettant les globules sensibilisés à du complément dépourvu de

troisième composant par action du zymosan, ce qui empêche l'hémolyse aussi longtemps que ce composant n'a pas été remplacé, mais laisse l'ensemble des trois autres se fixer sur les globules. Les globules ainsi traités sont devenus rapidement lysables par addition de sérum chauffé (qui apporte le composant manquant), mais ils perdent rapidement cette propriété lorsqu'on les maintient au préalable à 37°. Le phénomène ainsi établi incite à penser que le mécanisme de l'inactivation spontanée du premier composant non fixé n'est pas sans rapport avec celui de l'action hémolytique du complément. Que les ions Ca^{++} interviennent directement pour permettre à la fixation du premier composant de s'effectuer sur les globules sensibilisés (hypothèse de Levine et ses collaborateurs) ou que le premier composant se dénature rapidement si Ca^{++} ne le protège pas au moment où de nouvelles liaisons sont contractées, il semble que ces deux mécanismes supposés sont au fond assez voisins. Pillemer et ses collaborateurs penchent vers la deuxième hypothèse : Ca^{++} n'interviendrait pas directement dans la fixation du premier composant par les globules mais pourrait servir de substance protectrice contre une inactivation spontanée. Nos résultats conduisent à envisager une troisième hypothèse qui représente en quelque sorte une synthèse des deux autres : la capacité de fixation du premier composant sur les globules sensibilisés nécessite le maintien des ions Ca^{++} constitutifs de la forme moléculaire normale de ce réactif.

Il reste à considérer l'incidence pratique de ces recherches. Qu'il existe ou non des traces de calcium, de cuivre ou d'autres cations, dans l'eau ou la verrerie utilisée, que des variations toujours possibles se produisent dans la température des bains-marie ou des erreurs même très minimes dans la pesée du chlorure de sodium ayant servi à la préparation de l'eau physiologique, autant de causes de perturbation dont les effets peuvent être considérables sur le résultat d'un titrage de complément effectué après un séjour d'une heure à 37°, comme c'est le cas de la réaction de Kolmer si largement utilisée dans la pratique sérologique. Ces causes d'erreur sont d'autant plus à redouter qu'elles ne peuvent jouer à la température basse où l'on opère la fixation du complément sur les complexes antigène-anticorps, d'où un déséquilibre marqué si le titrage a été faussé. On conçoit donc qu'il puisse être très fréquent que des compléments, semblables quant à leur force hémolytique, se montrent différents entre les mains de plusieurs sérologistes n'opérant pas, à leur insu, dans des conditions exactement identiques de titrage. Il en résulte forcément des variations de sensibilité de la réaction de fixation effectuée par ces opérateurs, c'est-à-dire la possibilité de discordances marquées dans leurs résultats. Pour un même sérologiste les variations de

la sensibilité individuelle des différents lots de complément à l'inactivation à 37° peuvent entraîner des perturbations analogues. Or l'addition dans l'eau physiologique d'un sel calcique à concentration convenable (par exemple 1 p. 1 000 d'une solution à 2,50 p. 100 de Cl_2Ca , $2 \text{H}_2\text{O}$) suffit pour neutraliser en grande partie sinon en totalité toutes ces causes d'erreur. Devant ce résultat on peut rejeter l'objection que l'addition de calcium dans l'eau conduit à trouver une unité de complément très petite dont l'emploi peut rendre la réaction de fixation trop sensible et en conséquence pas assez spécifique. Il est combien préférable de mettre en jeu un nombre plus élevé d'unités si l'on craint cet inconvénient, d'ailleurs discutable, plutôt que de persister dans la véritable incohérence de titrage à laquelle conduisent presque toujours les techniques actuelles.

Conclusions.

1° L'activité hémolytique du complément contenu dans un sérum frais de cobaye ou d'homme baisse rapidement lorsqu'il est maintenu à 37° après avoir été fortement dilué dans de l'eau physiologique pure ou lorsqu'il est concentré, mais alors à condition que le calcium libre contenu dans le sérum ait été préalablement éliminé.

2° La cinétique de ce phénomène révèle une analogie avec celle de la plupart des réactions enzymatiques : existence d'une relation proportionnelle entre la vitesse d'inactivation à un instant donné et la concentration du complément resté actif dans la dilution, cela au moins aussi longtemps que l'inactivation n'est pas très avancée.

3° Parmi les différents composants du complément, seul le premier est atteint par l'inactivation progressive rapide à 37°.

4° Le phénomène est entravé par la présence d'ions Ca^{++} , à l'état de traces, dans le milieu et, au contraire, accéléré par d'autres cations divalents tels Zn^{++} et surtout Cu^{++} , à très faible concentration, ou encore par un excès d'ions Na^+ , comme s'est le cas dans les solutions hypertoniques de ClNa . De même, l'élévation de la température accélère l'inactivation du premier composant : dans ce cas aussi la présence d'ions Ca^{++} peut bloquer le mouvement.

5° L'action protectrice de Ca^{++} est spécifique. D'autres cations divalents comme Ba^{++} , Sr^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} (ce dernier renforçant l'activité hémolytique) ou des monovalents comme K^+ , Li^+ sont tous pratiquement sans effet sensible à l'état de traces ou, au contraire, nocifs pour l'hémolyse quand leur concentration atteint un certain niveau, mais aucun ne possède l'action protectrice remarquable de Ca^{++} .

6° Il existe une relation directe entre la concentration en ions Ca^{++} nécessaire pour protéger le premier composant et l'intensité de chacun des mécanismes agissant en sens inverse.

7° L'effet du calcium est réversible : un complément partiellement inactivé récupère une partie qui peut atteindre 90 p. 100 de son activité d'origine lorsque la concentration du milieu en ions Ca^{++} est ramenée à un niveau convenable.

8° La fixation du premier composant sur des globules sensibilisés (au premier stade du processus aboutissant à l'hémolyse) entraîne immédiatement l'arrêt de toute inactivation de ce facteur. A l'état fixé, il cesse également d'être sensible aux autres influences qui accélèrent sa disparition à l'état libre dans le sérum.

9° De tous ces faits, il ressort l'hypothèse que le premier composant existe dans le sérum sous forme de complexes au sein desquels les ions Ca^{++} jouent sans doute un rôle essentiel. La dissociation de ces complexes par des ions Na^+ dans les solutions à force ionique suffisante pour déplacer Ca^{++} , ou le remplacement de ces cations divalents par d'autres comme Cu^{++} et Zn^{++} entraîne une disparition (réversible au moins dans le cas de l'action de Na^+) de l'activité biologique du composant sensible, puis sa dénaturation définitive.

10° Le mécanisme de ce phénomène paraît en rapport avec celui de l'action hémolytique du complément tout entier.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. M. MAYER, A. G. OSLER, O. G. BIER et M. HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.
- [2] L. PILLEMER et E. E. ECKER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 101. — L. PILLEMER. *Chem. Rev.*, 1943, **33**, 1.
- [3] L. LEVINE, K. M. COWAN, A. G. OSLER et M. M. MAYER. *J. Immunol.*, 1953, **71**, 359.
- [4] I. H. LEPOW, L. PILLEMER et O. D. RATNOFF. *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 277.
- [5] L. PILLEMER, L. BLUM, J. PENSKY et I. P. LEPOW. *J. Immunol.*, 1953, **71**, 33.
- [6] A. S. BROWN, M. M. MICHELbacher et E. M. COFFEY. *Am. J. Clin. Path.*, 1954, **24**, 934.
- [7] J. A. KOLMER et E. R. LYNCH. *Am. J. Clin. Path.*, 1954, **24**, 946.
- [8] W. H. KELLOGG et L. A. WELLS. *J. Lab. Clin. Path.*, 1926, **12**, 153.
- [9] P. ROULIER. *Recueil Travaux Institut national d'Hygiène*, 1952, **4**, II, 823 ; *Sur une réaction quantitative du complément titré à 50 p. 100 d'hémolyse. Thèse de Pharmacie*. Montpellier, 1951.
- [10] M. VON KROG. *J. infect. Dis.*, 1916, **19**, 452.
- [11] P. BONÉT-MAURY et J. CHOUTEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 614.
- [12] B. H. WAKSMAN. *J. Immunol.*, 1949, **63**, 409.

- [13] J. GORDON, H. R. WHITEHEAD et A. WORMALL. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1036.
- [14] A. QUICK. *J. Immunol.*, 1935, **29**, 87.
- [15] O. GENGOU. *Ces Annales*, 1952, **83**, 561.
- [16] L. PILLEMER, L. BLUM, J. PENSKEY et I. H. LEPOW. *J. Immunol.*, 1953, **71**, 331.
- [17] L. PILLEMER, S. SEIFTER, F. CHU et E. E. ECKER. *J. exp. Med.*, 1942, **76**, 93.
- [18] E. E. ECKER et L. PILLEMER. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1942, **43**, 63.
- [19] E. A. KABAT, M. M. MAYER et M. HEIDELBERGER. *Experimental Immunochemistry*, C. C. Thomas, édit., Springfield, 1948.
- [20] L. PILLEMER et E. E. ECKER. *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 139.
- [21] L. PILLEMER, L. SEIFTER et E. E. ECKER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 89.
- [22] BRANDT. *Berl. klin. Wschr.*, 1907, n° 34, 1075.
- [23] L. LEVINE et M. M. MAYER. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 426. — L. LEVINE, M. M. MAYER et H. J. RAPP. *J. Immunol.*, **73**, 1954, 435. — M. M. MAYER, L. LEVINE, H. J. RAPP et A. MARUCCI. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 443.
- [24] M. HEIDELBERGER, O. G. BIER et M. M. MAYER. *Fed. Proceed.*, Part II, 1942, **1**, 178.
- [25] J. BORDET. *Traité de l'Immunité dans les Maladies Infectieuses*. Masson et C^{ie}, édit. Paris, 1939.

L'ÉQUIPEMENT DES MACROPHAGES EN PHOSPHOMONOESTÉRASES

par P. BRUYET, A. DELAUNAY et Ch. MEIGNIEN (*)

(Institut Pasteur, Garches)

INTRODUCTION

Nous voudrions rapporter ici les résultats que nous avons obtenus en étudiant l'équipement des macrophages en phosphomonoestérases.

Nous désignons sous le nom de *macrophages* ces grandes cellules que l'on rencontre en nombre important dans les réactions inflammatoires subaiguës ou chroniques. On sait qu'elles résultent de la métamorphose d'éléments divers : histiocytes, fibroblastes, monocytes, lymphocytes, etc.

Deux raisons principales nous ont incités à aborder cette question :

a) Nous avons déjà étudié l'équipement en phosphomonoestérases des polynucléaires inflammatoires (1) ; comment, dans ces conditions, n'aurions-nous pas songé à examiner aussi le cas de cet autre grand groupe de cellules phagocytaires que constituent les macrophages ?

b) Jusqu'à présent, à en juger du moins par ce qu'on trouve dans la littérature, les phosphomonoestérases macrophagiques n'ont guère retenu l'attention (2).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 mars 1955.

(1) Les résultats que nous avons recueillis sur ce sujet feront prochainement l'objet d'un mémoire général.

(2) On trouve, en effet, dans la littérature, très peu de travaux sur la teneur des macrophages en phosphomonoestérases. Citons, du moins, les suivants :

M. Chevrement, Le système histiocyttaire, *Biol. Rev.* 1948, **23**, 267.

E. A. Kabat et J. Furth, Histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and pathologic tissues, *Am. J. Path.*, 1941, **17**, 303.

Encore tous ces travaux ont-ils mis en œuvre non des méthodes de dosages microchimiques comme dans les recherches ici rapportées, mais des méthodes de détection histochimiques. Au demeurant, ils ne sont pas sans présenter, de l'un à l'autre, d'importantes contradictions. Voir, à ce sujet, l'article récent de J. E. French et A. Benditt, Observations on the localization of alkaline phosphatase in healing wounds, *Arch. Path.*, 1954, **57**, 352.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. — Mode d'obtention des macrophages.

Nous avons trouvé les macrophages nécessaires à nos essais dans des *exsudats péritonéaux* aseptiques.

Ces exsudats avaient été provoqués chez le cobaye par l'injection, au sein de la séreuse, de 18 ml d'*huile de paraffine*.

Quatre jours après l'injection, les cobayes sont sacrifiés, la cavité péritonéale est ouverte et le contenu abdominal lavé soigneusement avec de l'eau physiologique. Ce liquide de lavage contient en suspension, outre des gouttelettes d'huile, des leucocytes et des macrophages. Les macrophages sont, de loin, les cellules les plus nombreuses ; le pourcentage des polynucléaires rencontrés, quelque peu variable d'un cas à l'autre, reste dans l'immense majorité des cas inférieur à 10 p. 100.

Le liquide de lavage recueilli est aussitôt centrifugé à petite vitesse (1 000 tours/minute) pendant 2 minutes. Le culot obtenu est remis en suspension dans de l'eau physiologique. Cette opération, faite pour assurer un parfait lavage des éléments figurés, est renouvelée deux fois.

Après la dernière centrifugation, les cellules sont reprises par 10 ml d'eau physiologique saponinée à 2 p. 100. La saponine les tue et de nombreux principes cellulaires, notamment les enzymes, passent dans le liquide ambiant. (Pour plus de détails sur l'emploi de la saponine et son intérêt, se reporter à notre mémoire en cours de préparation sur les polynucléaires.)

II. — Technique de dosage utilisée.

La mise en évidence, par méthode chimique, des phosphomono-estérases comporte deux phases :

1° Le matériel enzymatique est mis en présence d'un substrat convenable, dans des conditions bien déterminées ;

2° Après arrêt de la réaction enzymatique, le phosphore minéral, libéré sous forme de phosphates, est dosé.

Chacune de ces opérations est menée parallèlement sur une préparation témoin ; ici, la solution enzymatique a été remplacée par un volume identique d'eau physiologique saponinée.

Pour les expériences rapportées ci-dessous, chaque dosage a été fait en double, les chiffres indiqués correspondant à la moyenne des résultats trouvés. Lorsque l'écart enregistré entre les deux dosages dépassait 10 p. 100 de la valeur la moins élevée, l'expérience, considérée comme nulle, était recommencée.

A. MISE EN ŒUVRE DE L'ACTION ENZYMATIQUE. — a) *Le substrat.* — Nous avons utilisé le *glycérophosphate de sodium du Codex*, mélange en proportions variables des sels de sodium des deux acides monoglycérophosphoriques α et β . Tous les essais rapportés ci-dessous ont été pratiqués avec le même échantillon de produit ; ainsi toute cause d'erreur résultant d'une activité enzymatique variable suivant le substrat (acides α ou β) ne peut être prise en considération.

Nous avons, pour le produit utilisé, adopté un poids moléculaire moyen de 310.

b) *pH et solutions tampons.* — Nous nous sommes servis de trois sortes de tampons :

Un tampon avec véronal sodique + véronal pour les pH supérieurs à 8 ;

Un tampon acide acétique, acétate de sodium pour les pH compris entre 3,5 et 7 ;

Un tampon à base d'acide sulfurique + acide acétique + glycine + soude permettant d'obtenir des pH variables de 2,5 à 10.

Les valeurs de pH indiquées ont été déterminées avant et contrôlées après la réaction.

c) *Détermination de la richesse en cellules des suspensions utilisées.* — Cette mesure a été faite par numération des éléments dans une cellule type Thoma-Bürker.

d) *Température.* — L'action enzymatique se déroulait à 37°, les tubes étant maintenus dans un bain-marie sensible au 1/2 degré. La suspension cellulaire (1 ml) était ajoutée aux tubes qui contenait déjà le substrat et le tampon seulement lorsque la température du mélange se trouvait stabilisée autour de 37°.

e) *Durée de la réaction.* — Comme nous le verrons au cours de ce travail, celle-ci a varié en fonction de la nature de nos essais.

f) *Arrêt de la réaction enzymatique.* — Pour cet arrêt, nous avons eu recours à l'acide trichloracétique en solution à 20 p. 100.

Le contenu des tubes était alors passé sur filtres Durieux lents, filtres lavés au préalable.

B. DOSAGE DU PHOSPHORE MINÉRAL LIBÉRÉ. — Nous avons employé, ici, la technique de Briggs qui est très sensible, même pour de faibles concentrations de phosphates.

Les résultats ont été exprimés en quantité de P (exprimée en μg) libérée par 1×10^6 macrophages, cela pour des durées d'incubation plus ou moins longues.

Lorsque, exceptionnellement, il n'en a pas été ainsi, le fait a été signalé.

III. — Résultats.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES ACTIVITÉS PHOSPHOMONOESTÉRASQUES
DES MACROPHAGES.

Dans une première série d'expériences, nous avons recherché une activité phosphomonoestérasique dans les zones de pH optimum que nous avons découverts pour les polynucléaires (soit une zone voisine de 5 et une autre zone voisine de 9,7).

a) Première série d'essais.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL. — 1° *Matériel enzymatique* : 6 exsudats péritonéaux, âgés de 4 jours, pauvres en polynucléaires (moins de 5 p. 100).

2° *Durée d'incubation* à 37° : 1 heure pour les trois premiers exsudats, 2 heures pour les trois autres.

3° *Substrat* : glycérophosphate de Na $2,5 \times 10^{-2}$ M.

4° *Effecteur* : néant.

5° *Tampons et pH* : 4 tampons différents (voir tableau).

Résultat : se reporter au tableau I.

TABLEAU I.

Numéros des exsudats	1	2	3	4	5	6
Nombre de macrophages ajoutés à chaque tube . . .	$2,8 \times 10^6$	5×10^6	$7,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$
Durée d'incubation en minutes . .	60	60	60	120	120	120
Tampon glycine 0,1 M. pH = 4,9 .	19,8	19,8	31,75	39,75	68	36
Tampon acétique 0,1 M. pH = 4,75.	20,2	20,25	32,10	45,5	76	38
Tampon glycine 0,1 M. pH = 9,7 .	0	0	0	Traces	Traces	Traces
Tampon véronal 0,1 M. pH = 9,75.	0	0	0	Traces	Traces	Traces

On voit d'après ce tableau, qu'en milieu alcalin, il n'y a pas eu libération de phosphore minéral.

Intrigués par ce fait, nous avons tenu à préciser la valeur des activités phosphomonoestérasiques à différents pH. Tel fut l'objet de notre seconde série d'essais.

b) Deuxième série d'essais.

Trois essais au total, certaines modalités opératoires restant les mêmes dans tous les cas, à savoir :

Durée d'incubation : 1 heure à 37°.

Substrat : glycérophosphate de Na $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Effecteur : néant.

Tampon : glycine 0,1 M + soude Q.V.

α) PREMIER ESSAI. — *Matériel enzymatique* : Suspension de macrophages faite avec le mélange de 4 exsudats différents et contenant $2,1 \times 10^6$ éléments par millilitre.

Pour les résultats, se reporter au tableau II.

TABLEAU II.

pH de la réaction . .	4,2	4,45	4,6	4,75	4,85	4,95	5,05	5,30	5,70
Quantité de P minéral exprimés en μg libérée par 1×10^6 cellules.	22,5	25	27	27,5	30,5	31,25	31,50	34	32,5
pH de la réaction . .	6,30	7,15	8,80	9,30	9,45	9,60	9,70	9,80	10,05
Quantité de P minéral exprimés en μg libérés par 1×10^6 cellules	28,25	10,75	0	0	0	0	0	0	0

β) DEUXIÈME ESSAI. — Son but était d'étudier avec plus de soin encore la zone des pH comprise entre 7 et 9.

Matériel enzymatique : Suspension de macrophages faite avec le mélange de 5 exsudats différents et contenant 4×10^6 éléments par millilitre.

Pour les résultats, se reporter au tableau III.

TABLEAU III.

pH de la réaction . . .	4,95	5,10	5,3	5,4	5,6	5,8	6,0	6,2	6,35
P minéral en g pour 1×10^6 cellules . . .	36	36	38	38	39	38	35,5	34	32,5
pH de la réaction . .	7,1	7,3	7,55	7,85	8,1	8,4	8,5	8,8	8,95
P minéral en μg pour 1×10^6 cellules . .	13,5	10,75	6	3	1	0,25	0	0	0

γ) TROISIÈME ESSAI. — Il devait préciser ce qui se passe dans les zones les plus acides.

Matériel enzymatique : Suspension de macrophages faite avec

le mélange de 4 exsudats différents et contenant 4×10^6 éléments par millilitre.

Pour les résultats, se reporter au tableau IV.

TABLEAU IV.

pH de la réaction. . .	2,6	2,85	3,20	3,45	3,85	4,2	4,45	4,7	4,85
P minéral en μg pour 4×10^6 cellules . . .	0	0	0	3,75	14,5	26,5	29	31,5	32,25
ph de la réaction. . .	5,1	5,4	5,8	6,25	7,05	8,7	9,2	9,55	9,75
P minéral en μg pour 4×10^6 cellules . . .	35	33,5	36,5	31	18,25	1	0	0	0

L'ensemble des résultats fournis par notre seconde série d'essais se trouve reporté sur la figure 1.

On remarque, en l'étudiant, que, *seule a pu être mise en évidence une phosphomonoestérase acide*. L'examen des courbes en milieu alcalin ne montre l'amorce d'aucune activité phosphomonoestérasique.

c) Troisième série d'essais.

La phosphomonoestérase alcaline a la réputation d'être très répandue dans le règne animal. On imagine donc notre surprise lorsque nous obtenmes les résultats que nous venons d'exposer.

Quelle explication convenait-il de leur donner ? Nous nous sommes demandé si, dans le cas présent, la P. M. E. alcaline n'avait pas été inhibée par l'huile de paraffine utilisée pour déclencher l'apparition d'exsudats péritonéaux ; effectivement, l'examen microscopique des macrophages retirés de ces exsudats montre, dans leur sein, de nombreuses gouttelettes huileuses.

Pour élucider ce point, nous avons décidé d'étudier l'influence de l'huile de paraffine sur la P. M. E. alcaline des polynucléaires.

Ces derniers ont été obtenus par notre méthode habituelle : injection de bouillon peptoné stérile (10 ml) dans le péritoine de cobayes neufs ; ponction de la séreuse, 5 heures plus tard. L'exsudat inflammatoire recueilli dans ces conditions renferme environ 80 p. 100 de polynucléaires. Ces cellules sont réunies en culot par centrifugation rapide ; elles sont lavées avec de l'eau physiologique, enfin remises en suspension dans notre milieu saponiné.

D'une part, nous avons ajouté à 10 ml d'une suspension de polynucléaires préparée comme nous venons de le dire, 1 ml d'huile de paraffine, puis nous avons agité ce mélange, régulièrement, toutes les 5 minutes. Entre temps, le tube était maintenu

dans un bain-marie à 37°. Au bout de 1 heure, nous avons isolé et lavé les polynucléaires (un rapide examen microscopique nous a appris qu'ils n'avaient pas phagocyté l'huile) puis dosé, pour ces cellules, la P. M. E. alcaline par notre procédé habituel.

D'autre part, nous avons fait certains dosages en présence

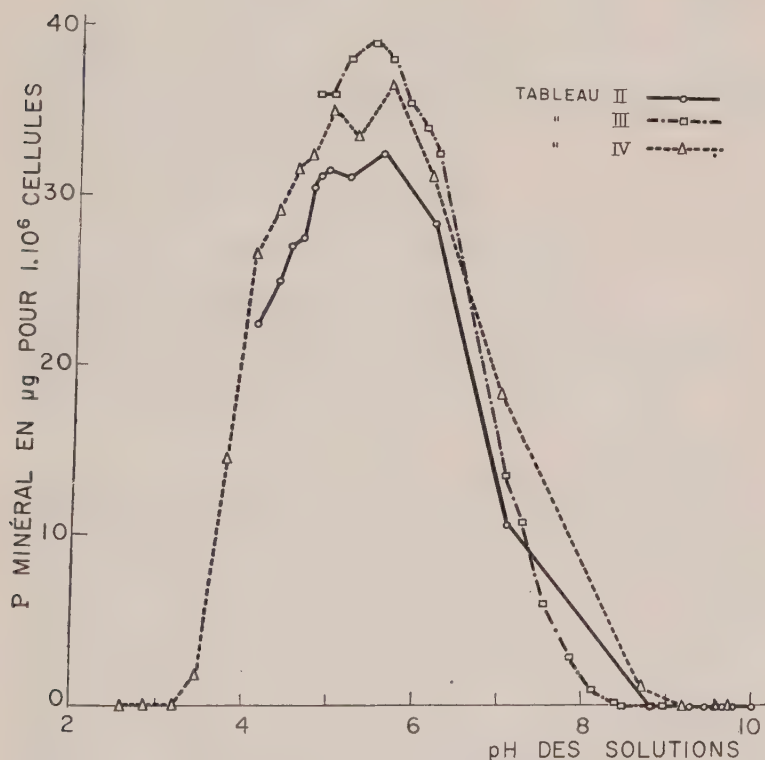


FIG. 1. — pH optimum pour les P. M. E. des macrophages.

même d'huile de paraffine (cette dernière agissait donc, en ce cas, durant la période d'incubation).

Chaque fois, un tube témoin fut préparé : la suspension cellulaire y avait été remplacée par de l'eau physiologique saponinée.

Durée d'incubation : 1 heure à 37°.

Substrat : glycérophosphate de sodium, $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Effecteur : huile de paraffine.

pH et tampons : glycine, 0,1 M, d'une part ; pH : 9,7. Véronal, 0,1 M, d'autre part ; pH : 9,75.

Pour les résultats, se reporter au tableau V.

TABLEAU V.

Tampons	Glycine 0,1 M	Véronal 0,1 M
P minéral libéré par 4×10^6 polynucléaires traités au préalable par l'huile de paraffine	39,6	46,8
Témoins	39,5	46,5
P minéral libéré par 4×10^6 polynucléaires maintenus en présence d'huile de paraffine	39,6	46,5
Témoins	39,6	46,6

Conclusion : L'huile de paraffine n'est pas capable d'inhiber l'activité de la P. M. E. alcaline pour les polynucléaires inflammatoires.

d) *Quatrième série d'essais.*

Nous nous sommes alors demandé si, dans les macrophages, n'existait pas un inhibiteur naturel vis-à-vis des P. M. E. alcalines rencontrées très généralement dans les cellules vivantes.

Pour étudier ce nouvel aspect de la question, nous avons fait agir la P. M. E. alcaline provenant de polynucléaires en présence de macrophages.

En pratique, deux essais ont été réalisés selon le protocole suivant. Huit tubes, contenant le substrat tamponné, ont été répartis en 4 groupes de 2.

Le groupe n° 1 a reçu par tube, 1 ml d'une suspension de polynucléaires diluée au demi par de l'eau physiologique saponinée.

Le groupe n° 2 a reçu, également par tube, 1 ml d'une suspension de macrophages diluée au demi par de l'eau physiologique saponinée.

Le groupe n° 3 : 1 ml d'un mélange, en parties égales, des suspensions de polynucléaires et de macrophages utilisées ci-dessus.

Le groupe n° 4 : 1 ml d'eau physiologique saponinée (tubes témoins).

Les conditions opératoires ont un peu varié selon les essais.

α) *PREMIER ESSAI. — Matériel enzymatique :* suspension contenant par millilitre 12×10^6 polynucléaires et 4×10^6 macrophages.

Incubation : 1 heure à 37° .

Substrat : glycérophosphate de sodium, $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Effecteur : néant.

pH et tampon : tampon véronal, pH : 9,65.

Pour les résultats, se reporter au tableau VI.

TABLEAU VI.

Groupes de tubes	1	2	3	4
Quantité totale de P minéral en μg libéré au cours de la réaction (moyenne des deux tubes).	329	0	327	0

β) DEUXIÈME ESSAI. — Mêmes conditions opératoires que ci-dessus, à une différence près cependant, le matériel enzymatique étant cette fois constitué par une suspension qui contenait, au millilitre, $4,5 \times 10^6$ polynucléaires et 4×10^6 macrophages.

Résultats : voir le tableau VII.

TABLEAU VII.

Groupe de tubes	1	2	3	4
Quantité totale de P minéral en μg libéré au cours de la réaction (moyenne des deux tubes).	98,5	0	99,5	0

e) Cinquième série d'essais.

Rendus à ce point, nous savions que la P. M. E. alcaline des polynucléaires n'est pas inhibée par des extraits de macrophages. Sur le conseil du professeur Courtois, nous avons alors songé, pour les expériences dont il est ici question, à prolonger considérablement le temps d'incubation ; celui-ci fut porté à 24 heures.

Nous avons opéré à 3 pH différents, le premier nous mettant dans les limites d'activité de la P. M. E. acide des macrophages. Les conditions pratiques de ces essais ont été les suivantes.

Matériel enzymatique : suspension provenant du mélange de 3 exsudats péritonéaux âgés de 4 jours et contenant, par millilitre, 2×10^6 macrophages et $0,15 \times 10^6$ polynucléaires.

Durée d'incubation : 24 heures à 37° .

Substrat : glycérophosphate de sodium, $2,5 \times 10^{-2}$ M.

TABLEAU VIII.

	AVEC Cl_2Mg			SANS Cl_2Mg		
	8,4	8,7	9,5	8,4	8,7	9,5
pH de la réaction						
Quantité de P minéral en μg libéré par 1 ml de suspension cellulaire en 24 h.	37	20,5	26,5	95,5	12,5	16

Effecteur : 2 groupes de tubes, l'un sans effecteurs, l'autre recélant du Cl_2Mg , $2,5 \times 10^{-3}$ M.

pH et tampons : véronal, véronal sodique, 0,1 M.

Les résultats donnés par ces essais sont reportés dans le tableau VIII.

La lecture de ce tableau montre qu'une faible activité phosphatase s'est manifestée en milieu alcalin. Mais n'oublions pas qu'ici notre préparation contenait une certaine quantité de polynucléaires. L'activité la plus forte se trouve aux pH 8,4 et surtout 8,1, zones où additionnent leur activité les P. M. E. acide des macrophages et alcaline des polynucléaires.

f) Sixième série d'essais.

Pour cette nouvelle série, nous nous sommes servis d'une préparation plus riche en polynucléaires que les précédentes, à un pH voisin de 9,5 pour des durées d'incubation variables : de 1 heure à 24 heures, cela afin de savoir si les activités P. M. E. alcalines trouvées ci-dessus étaient uniquement dues aux polynucléaires (en pratique, nous avons eu recours à un exsudat péritonéal produit, comme de coutume, par une injection d'huile de paraffine, mais le prélèvement avait été fait au bout de 3 jours seulement).

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES. — *Matériel enzymatique* : préparation contenant, au millilitre, 12×10^6 macrophages et $1,8 \times 10^6$ polynucléaires.

Substrat : glycérophosphate de sodium, $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Effecteur : 2 séries d'essais, l'un sans effecteur, l'autre avec Cl_2Mg .

Durée d'incubation à 37° variable : 1 heure, 1 h 30, 2 heures et 24 heures.

pH et tampons : 9,7 avec tampon véronal, 0,1 M.

Pour les résultats, se reporter au tableau IX.

TABEAU IX.

	AVEC Cl_2Mg				SANS Cl_2Mg			
	1	1,30	2	24	1	1,30	2	24
Durée d'incubation à 37° en h. et min.								
P minéral libéré par 1 ml de suspension cellulaire en μg	78	123	161	470	37	62	84	432
Nombre de polynucléaires par ml $\times 10^6$	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
P minéral libéré par 1×10^6 polynucléaires en μg .	43,3	68,5	89,5	260	20,6	34,5	46,6	240

A la lecture de ce tableau, on peut constater une certaine activité P. M. E. en milieu alcalin, mais on a le droit d'admettre que, seuls, les polynucléaires sont en cause puisqu'on trouve (voir troisième ligne) des activités P. M. E. comparables à celles que donnent classiquement les seuls polynucléaires.

CONCLUSION GÉNÉRALE DES SIX ESSAIS PRÉCÉDENTS.

Elle pourrait être celle-ci : dans les conditions expérimentales retenues par nous, nous avons été incapables de mettre en évidence, pour des macrophages d'origine inflammatoire, une P. M. E. active en milieu alcalin.

Ce fait une fois bien établi, nous avons reporté toute notre attention sur la P. M. E. acide. D'une part, nous avons étudié la cinétique de la réaction enzymatique ; de l'autre, nous avons essayé de dévoiler l'action exercée ici par trois effecteurs classiques des P. M. E.

Le protocole expérimental suivi et les résultats obtenus font précisément la matière de la seconde partie de ce travail.

DEUXIÈME PARTIE

SUR QUELQUES CARACTÈRES DE LA P. M. E. ACIDE DES MACROPHAGES.

1° Etude de la cinétique de l'activité phosphomonoestérasique acide.

a) PREMIER ESSAI.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE. — *Matériel enzymatique* : suspension cellulaire contenant, par millilitre, $7,6 \times 10^6$ macrophages.

Substrat : glycérophosphate de sodium, $2,5 \times 10^{-2}$ M.

Tampon et pH : acide acétique, acétate de sodium à pH 4,9.

Durées d'incubation à 37° : 0 min., 15 min., 30 min., 45 min., 1 heure, 1 h. 15, 18 h. 30.

Effecteur : néant.

TABLEAU X.

Durée d'incubation en heures et minutes.	0,15	0,30	0,45	1,00	1,15	18,30
P minéral en μg retrouvé dans l'essai.	57	117	169	218	267	1300
P minéral en μg libéré par 1×10^6 él. . .	7,5	15,4	22,9	28,7	35	171
p. 100 de substrat hydrolysé . . .	0,93	1,92	2,77	3,57	4,37	21,3

Pour les résultats, se reporter au tableau X.

On voit d'après ce tableau que, pour les 5 premiers temps d'incubation, la quantité de P minéral libéré est directement proportionnelle à la durée de l'incubation. Mais il n'en est pas de même pour le sixième tube puisque, cette fois, la quantité de glycérphosphate hydrolysée atteint 21 p. 100.

b) DEUXIÈME ESSAI.

Ici, nous avons réduit la richesse de la préparation en substrat, cela afin de déterminer quel est le pourcentage critique de glycérphosphate hydrolysé qui entraîne une inhibition de l'activité phosphomonoestérasique.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE. — *Matériel enzymatique* : suspension cellulaire contenant, par millilitre, $2,4 \times 10^6$ macrophages.

Substrat : glycérphosphate de Na : $6,25 \times 10^{-3}$ M.

Tampon et pH : une série d'expériences a été faite avec un tampon acétique, pH 4,75 ; une autre avec un tampon glycine, pH 4,70.

TABLEAU XI.

I. — Tampon acétique.							
Durée d'incubation en min.	30	60	90	120	135	150	165
P en μg retrouvé dans la préparation	44,7	26,6	39,6	47	58,6	68	77,2
P en μg libéré par 1×10^6 cellules	6,15	11,05	16,5	19,5	24	28,25	32,25
p. 100 de substrat hydrolysé.	0,98	1,75	2,65	3,15	3,90	4,55	5,15
II. — Tampon glycine.							
Durée d'incubation en min.	30	60	90	120	135	150	165
P en μg retrouvé dans la préparation	14,5	29,2	42,5	57,5	65,5	73,25	80,5
P en μg libéré par 1×10^6 cellules	6	12,2	17,75	24	27,25	30,5	33,5
p. 100 de substrat hydrolysé.	0,96	1,95	2,83	3,83	4,35	4,90	5,35

Durées d'incubation à 37° : 0 min., 30 min., 60 min., 1 h. 30, 2 heures, 2 h. 15, 2 h. 30 et 2 h. 45.

Effecteur : néant.

Pour les résultats, se reporter au tableau XI.

L'ensemble de ces résultats est reporté sur la figure 2. On peut voir, sur cette figure, que, jusqu'au taux de 5,15 et de 5,35 p. 100

de glycérophosphate hydrolysé, l'inhibition par le phosphore minéral libéré n'apparaît pas.

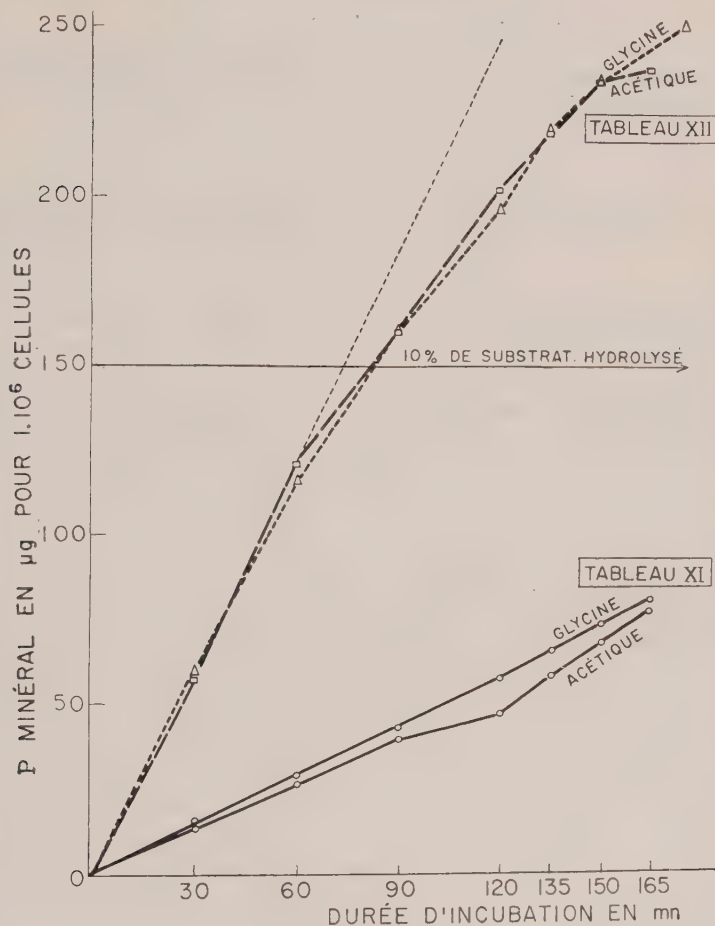


FIG. 2.

c) TROISIÈME ESSAI.

Cette nouvelle série se caractérise par l'emploi d'une suspension de macrophages particulièrement riche avec les modalités suivantes.

Matériel enzymatique : suspension contenant, au millilitre, 10×10^6 macrophages.

Substrat : glycérophosphate de sodium, $6,25 \times 10^{-3}$ M.

Effecteur : néant.

Durées d'incubation à 37° : 30 min., 1 heure, 1 h. 30, 2 heures, 2 h. 15, 2 h. 30, 2 h. 45.

Tampons et pH : une série d'expériences a été faite avec le tampon acétique, pH 4,75 ; une autre série avec le tampon glycine, pH 4,70.

Pour les résultats, se reporter au tableau XII.

TABLEAU XII.

I. — Tampon acétique.							
Durée d'incubation en min.	30	60	90	120	135	150	165
P en μg retrouvé dans la préparation.	57,5	121	159	202	218	234	238
P en μg libéré par 1×10^6 cellules.	5,75	12,1	15,9	20,2	21,8	23,4	23,8
p. 100 de substrat hydrolysé.	3,85	8,05	10,6	13,45	14,5	15,6	15,9
II. — Tampon glycine.							
Durée d'incubation en min.	30	60	90	120	135	150	165
P en μg retrouvé dans la préparation.	59,5	116	160	197	220	234	251
P en μg libéré par 1×10^6 cellules.	5,95	11,6	16	19,7	22	23,4	25,1
p. 100 de substrat hydrolysé.	3,97	7,75	10,65	13,10	14,65	15,60	16,75

L'ensemble de ces résultats est aussi reporté sur la figure 2. On constate que, lorsque le taux de glycérophosphate hydrolysé atteint 10 p. 100, l'activité de la P. M. E. se trouve inhibée.

2° Etude de l'action de divers effecteurs.

Nous avons utilisé ici quelques effecteurs classiques, comme le Mg, le Zn et l'acide borique. Cet essai a été pratiqué, avec deux tampons, en milieu acide et en milieu alcalin.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE. — *Matériel enzymatique* : suspension contenant, par millilitre, 4×10^6 macrophages et $0,15 \times 10^6$ poly-nucléaires.

Durée d'incubation : 1 heure à 37°.

Effecteur : Mg sous forme de $\text{Cl}_2 \text{Mg}$: $2,5 \times 10^{-3}$ M ; Zn sous forme d'acétate de Zn : $2,5 \times 10^{-4}$ M ; acide borique sous forme de borate de Na : $2,5 \times 10^{-3}$ M.

Tampons et pH : acétique, 0,1 M à pH 4,75 ; glycine acide,

0,1 M à pH 4,75 ; véronal, 0,1 M à pH 9,85 ; glycine alcaline, 0,1 M à pH 9,75.

Pour les résultats, se reporter au tableau XIII.

TABEAU XIII.

TAMPONS UTILISÉS		ACÉTIQUE pH 4,75	GLYCINE acide pH 4,75	VÉRONAL pH 9,85	GLYCINE alcalin pH 9,75
P minéral libéré en	néant	27,5	31	0	0
60 minutes par 1×10^6	Mg	28	31,5	0	0
10^6 cellules en pré-	Zn	28	31	0	0
sence de	Borate	27,5	31	0	0

De la lecture de ce tableau, deux notions essentielles se dégagent :

- a) En milieu alcalin, aucune activité enzymatique perceptible ;
- b) L'activité phosphomonoestérasique des macrophages n'est pas modifiée par les trois effecteurs que nous avons choisis, du moins aux doses indiquées.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

1° Les auteurs ont pu mettre en évidence, dans des extraits de macrophages, une phosphomonoestérase active en milieu acide. En revanche, ils ont été incapables de démontrer aussi l'existence d'une P. M. E. alcaline.

2° Pour tenter de trouver une explication à ce résultat négatif, ils ont étudié notamment l'influence possible d'un inhibiteur externe (en l'espèce, l'huile de paraffine utilisée pour provoquer l'apparition des exsudats péritonéaux d'où étaient extraits les macrophages), ou celle d'un inhibiteur interne, mais en vain.

3° La P. M. E. acide voit son activité inhibée quand plus de 10 p. 100 du substrat ont été déjà hydrolysés. Cette activité reste normale en présence de magnésium, de zinc et d'acide borique.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHYTO-AGGLUTININES ET DE LEUR RÔLE AU COURS DES SYNDROMES HÉMOLYTIQUES EXPÉRIMENTAUX

par A. EYQUEM, M. SAINT-PAUL et J. MAGNIN (*)

(Institut Pasteur. Laboratoire d'Hématologie
et des Groupes Sanguins)

I. — SPÉCIFICITÉ DES PHYTOAGGLUTININES.

Bien que la découverte des phytoagglutinines remonte à la fin du siècle dernier, c'est seulement au cours de ces dernières années qu'on a entrepris l'examen systématique de ces substances. Plusieurs d'entre elles ont fait l'objet d'études classiques de Kobert et son école : la ricine (Stillmark, 1887 ; Jacoby, 1901) de *Ricinus communis* ; l'abrine (Hellin, 1881) d'*Abrus precatorius* ; la robine (Lau, 1901) de *Robinia pseudoacacia* ; la crotine (Elfstrand, 1898) de *Croton tiglium*. Les graines de certains *Datura* contiennent une agglutinine active sur les globules rouges (Eisler et Portheim, 1909). C'est à Landsteiner et Raubitschek (1909) que revient le mérite d'une étude détaillée des substances agglutinantes des Papillonacées : le Haricot (*Phaseolus*), le Pois (*Pisum*), la Lentille (*Ervum*) et le Vesce (*Vicia*), agglutinent, avec des intensités diverses suivant les espèces, les globules rouges d'homme, cheval, lapin, mouton, pigeon, carpe, grenouille. Ces substances précipitent avec les sérums de cheval et de poule.

La Phasine (ou Phaséoline pour d'autres auteurs) de *Phaseolus vulgaris*, étudiée par Wienhaus (1909), est active sur les globules rouges, les globules blancs, les broyats de tissus animaux (foie de chat, chien, poulet, rein de poulet), mais non sur le lait et les albumines en solution. Quoique non nocive sur le cœur isolé de grenouille, elle est, à doses massives, toxique chez les mammifères. Relativement thermostable, elle est détruite à 90°. Elle résiste bien aux enzymes (pepsine, trypsine, papaïne). Elle est peu

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mars 1955.

altérée par le toluène, le chloroforme, l'eau oxygénée, le fluorure de sodium, le formol, et non par les solutions neutres et isotoniques de sels minéraux autres que NaCl.

Le complément ne joue pas de rôle dans son action agglutinante et on peut, par la soude en solution, séparer la phaséoline de l'agglutinat.

Le titre agglutinant est de 1/6 000 pour le mouton, 1/35 000 pour le lapin, 1/1 000 pour le hériçon, 1/600 pour la carpe. L'auteur indique également les titres agglutinants des extraits de Fève de marais, Soja, Pois, Vesce, Datura.

L'agglutinine de la Fève Jack (*Canavalia ensiforme*) agglutine les globules rouges de chat, cobaye à 1/30 000, ceux d'homme à 1/5 000 (Assmann, 1910). Sumner et Graham (1925), étudiant les globulines de la Fève Jack, ont isolé la concanavaline A et B et la canavagine.

Les tubercules de pomme de terre (Marcusson-Begun, 1926) contiennent une agglutinine active sur les globules rouges des mammifères, en particulier sur ceux du rat (1/50 000), plus faiblement sur ceux de l'homme, lapin, cobaye, porc, souris, mouton, très peu sur ceux du cheval et du bœuf. Il y a des différences suivant les échantillons de globules rouges humains. Le sérum humain est inhibiteur à forte concentration.

Fujiwara (1923) a isolé l'hémagglutinine du Soja, par adsorption sur kaolin, hydroxyde d'alumine ou phosphate de calcium, puis élution par les alcalins faibles : elle agglutine les globules rouges de lapin à 1/6 400-1/12 800. Par immunisation du lapin on obtient un immunosérum qui possède un effet inhibiteur assez spécifique.

La phytoagglutinine de *Phaseolus communis* a été préparée à l'état pur par Goddard et Mendel (1929), suivant le procédé déjà employé par Osborne, Mendel et Harris, pour obtenir la ricine pure. Cette phytoagglutinine, préparée par Peeters (1932) par précipitation par l'alcool à 100°, et dissoute en poudre dans l'eau physiologique, agglutine les globules rouges aux titres suivants : mouton, 1/15 000 ; lapin, 1/24 000 ; cobaye, 1/24 000 ; poule, 1/4 000 ; chien, 1/8 000 ; rat, 1/6 000 ; cheval, 1/200 000 ; souris, 1/4 000 ; mulet, 1/15 000. Les globules des bœufs examinés fixent l'agglutinine sans être agglutinés.

Ces études classiques permettaient déjà de poser la question de la nature des phytoagglutinines et de leur spécificité. On a voulu voir (Mendel) des relations entre le pouvoir agglutinant et le pouvoir lipolytique. Landsteiner (1915), après avoir cité le cas de la ricine et de l'abrine, cite celui de l'agglutination des globules rouges de lapin et de pigeon par l'extrait de Haricot (1/125 et 1/2 000) et de Lentille (1/160 et 0) et de ceux de cheval et de pigeon par l'abrine (1/128 et 1/256) et la ricine (1/4 et 1/512).

Constatant que l'activité des agglutinines végétales n'est pas limitée à un seul substrat, quoi qu'elle soit dans une certaine mesure sélective, il en arrive à une nouvelle définition de la *spécificité* qui est l'action disproportionnelle d'un certain nombre d'agents similaires sur une variété de substrats apparentés.

D'autres résultats ont été acquis plus récemment :

Renkonen (1949) a repris l'étude des phytoagglutinines des légumineuses à partir d'extraits aqueux et a ainsi étudié 99 espèces. Soixante-huit d'entre elles n'avaient aucune propriété agglutinante, 31 appartenant aux Papillonacées donnent des extraits agglutinants non spécifiques et en général peu actifs. Beaucoup de ces espèces non sélectives ont néanmoins une activité anti-O un peu plus élevée que l'anti-A ou l'anti-B. C'est le cas de *Phaseolus vulgaris* : par l'absorption de son extrait avec des globules rouges A₁, A₂, B ou O, on obtient à chaque fois une diminution parallèle du taux d'agglutination pour les autres sortes de globules rouges.

Des propriétés sélectives existent dans les extraits de 6 plantes, soit *Vicia cracca*, surtout anti-A₁, et un peu moins anti-A₂, *Lotus tetragonolobatus*, *Laburnum alpinum* et *Cytisus sessifolius*, surtout anti-O et anti-A₂, *Cytisus praecox* et *C. ratisbonensis* var. *biflorus*.

Simultanément, Boyd et Reguera (1949) ont étudié les extraits aqueux des graines de 262 variétés de plantes provenant de 63 familles vis-à-vis des globules rouges humains. Cent dix-neuf n'avaient aucune activité agglutinante, 46 étaient agglutinantes sans spécificité, 25 donnaient des différences dans l'agglutination, notamment certains Haricots de Lima (*Phaseolus limensis*) qui sont surtout anti-A. Les extraits de feuilles ou de fruits de 9 espèces étaient inactifs sauf dans une espèce. Il n'a pas été non plus possible de mettre en évidence une spécificité anti-MN ou anti-Rh. En appliquant la méthode utilisée par Sumner pour la Fève Jack, on peut isoler à l'état pur une globuline active. Les extraits de plantes d'origine égyptienne et des autres pays du Proche-Orient ont permis également à Boyd d'obtenir un certain nombre d'extraits agglutinants pour les légumineuses, avec la spécificité anti-A de diverses variétés de *Ph. limensis* et un *Ph. lunatus*, mais aucun anti-B. Une faible agglutinine, non spécifique a été trouvée chez une Cucurbitacée, *Cucumis* (pastèque).

Cytisus sessifolius et *Vicia cracca* sont utilisables pour la différenciation des sous-groupes de A : A₁, A₂, A₁B et A₂B, car les extraits se comportent comme du sérum anti-A₁ absorbé (Koulumies, 1949).

Munter (1949) a constaté que sur 215 espèces de plantes provenant de 50 familles différentes, 192 espèces sont inactives. L'étude comparative des agglutinines des légumineuses et du

TABLEAU I. — Légumineuses possédant une hémagglutinine spécifique.

<u>Genistae</u>			
<i>Laburnum alpinum</i>	anti O faible	R	(1)
<i>Ulex provencialis</i> Lois	anti O	C-L	(2)
<i>Ulex jus izei</i> Webb	anti O	C-L	
<i>Ulex europeus</i> L. (Coimbra)	anti O	C-L	
<i>Cytisus sessifolius</i>	anti O	R	
" <i>praecox</i>	anti O faible	R	
" <i>rastibonensis</i> (biflorus)	anti O faible	R	
" " <i>multiflorus</i>)	anti O	B-R	(3)
" <i>argenteus</i> L.	anti O	C-L	
<i>Genista sagittalis</i>	anti O	B-R	
" <i>canariensis</i>	anti O	B-R	
<u>Lotae</u>			
<i>Lotus tetragonolobatus</i>	anti O faible	R	
<i>Tetragonolobatus purpureus</i> Webb	anti O	C-L	
<u>Gelegeae</u>			
<i>Amorphe fruticose</i>	anti A faible	B-R	
<i>Cyanopsis psoralioïdes</i>	anti A	C-L	
<u>Viciae</u>			
<i>Cicer arietinum</i>	anti A faible	B-R	
<i>Vicia cracca</i>	anti A	R	
<i>Vicia cracca</i> L.	anti A	C-L	
<i>Lathyrus odoratus</i>	?	B-R	
<i>Lathyrus sylvestris</i> L.	anti A	C-L	
<i>Pisum sativum</i>	anti A	B-R	
<i>Vicia graminea</i>	anti N	OTFENSOOSER-SILBER-SCHMIDT	
<u>Phaseoleae</u>			
<i>Mucuna urens</i> Dc.	anti A faible	C-L	
<i>Phaseolus lunatus</i>	anti A	B-R	
" <i>vulgaris</i> (diverses variétés)	anti A	B-R	
" <i>limensis</i> var. <i>limeanus</i> :			
("empire state lima Bean")	anti A	BOYD	
("Leviathan lima Bean")	anti A faible	BOYD	
<i>Phaseolus</i> sp ("Speckled Bean")	?	B-R	
<i>Phaseolus</i> sp ("Pea Bean")	?	B-R	
<i>Phaseolus</i> sp ?	anti A faible	BOYD	
<i>Dolichos biflorus</i>	anti A	B-R et BIRD	
<u>Sophoreae</u>			
<i>Sophora japonica</i>	anti B	KRUPE	
<u>Hedysareae</u>			
<i>Coronilla varia</i>	anti B	KRUPE	

CHAMPIGNONS récemment étudiés

<i>Clitocybe nebularis</i>	anti A ₁	Tetry, Sutton, Moulic.
Ascomycète <i>xylaria</i> polymorphe	anti O	Tetry, Sutton, Moulic.

(1) R, d'après Renkonen.

(2) C-L, d'après Casal et Lalaurie.

(3) B-R, d'après Boyd et Reguera.

Datura avec celles des autres familles végétales, montre que ces dernières sont faibles.

Grubb (1949) n'a pas retrouvé, avec les graines de *Cytisus sessifolius* poussant à Lund, les résultats de Renkonen.

Boyd (1952) a précisé la constitution chimique de la phytoagglutinine anti-A du Haricot de Lima. Le traitement avec de la soude décinormale ou du formol à 4 p. 1 000 détruit son pouvoir agglutinant. La diazotation de plusieurs amines avec cette globuline végétale est possible. On peut ainsi introduire dans la molécule protéique des quantités considérables d'aniline, d'acide para-amino-benzoïque, d'acide arsanilique et d'autres esters aromatiques ; néanmoins, un trop grand excès de ces substances détruit l'activité agglutinante. L'activité agglutinante n'est pas non plus modifiée par la copulation avec la triméthyl-amino-aniline, sauf s'il y a excès de ce composé.

Ces expériences semblent indiquer que les groupes aminés de la protéine ne jouent pas un rôle capital dans la réaction avec la substance A. Au cours de recherches anthropologiques sur les Irlando-Américains (Saint-Paul et Walsh, 1952) en utilisant de la phytoagglutinine anti-A du Haricot de Lima préparée par Boyd, il a été possible de montrer qu'elle est parfaitement utilisable pour des examens en grande série, tels qu'on les pratique en anthropologie.

Cazal et Lalaurie (1952) ont étudié les graines de légumineuses. Neuf d'entre elles ont une phytohémagglutinine spécifique d'un antigène érythrocytaire. Les anti-O se trouvent chez certaines *Gentiseae* et *Loteae*, les anti-A chez certaines *Galeageae*, *Viciae* et *Phaseolae*. L'agglutinine anti-A a une affinité plus grande pour les A_1 que pour les A_2 , mais ne se dédouble pas en deux anticorps différents.

Des graines de *Sophora japonica* possèdent une hémagglutinine anti-B (Krüpe, 1952). En effet, l'extrait aqueux de ces graines agglutine les hématies humaines B à 1/256 ; A_1 , 1/32, A_2 , 1/4 ; celles de lapin à 1/16, de porc à 1/8. Elle est sans action sur les globules rouges humains O, et sur ceux de cobaye, mouton, souris, bœuf. Des essais d'immunisation de la souris avec de l'anti-O provenant de *Cytisum laburnum alpinum* ont donné, dans des expériences d'inhibition de l'agglutination, des résultats positifs. Les phytoagglutinines seraient des globulines qui joueraient peut-être un rôle dans la croissance des plantes.

Le mécanisme d'action de l'agglutinine anti-O de *Laburnum alpinum* a été étudié par Punin (1952). Alors que le formol à 2 p. 100 annule l'action de l'anti-O d'origine animale, celui provenant de *Laburnum alpinum* n'est pas détruit, même par le formol à 4 p. 100. Il faut y ajouter le chauffage à 56° pendant une demi-heure. L'étude dans des milieux de concentration

ionique diverse montre que l'extrait végétal se comporte comme un véritable anticorps.

Les extraits de graines de *Dolichos biflorus* permettent de distinguer l'agglutinogène A₁ de l'agglutinogène A₂ (Bird, 1952). Cette hémagglutinine n'est pas anti-Forssman, mais plus proche de l'hémagglutinine humaine anti-A. De même, les extraits aqueux de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) contiennent des agglutinines actives sur les globules rouges A, B et O.

Les hémagglutinines anti-A extraites de *Dolichos biflorus* et de *Phaseolus limensis* réagissent mal avec les hématies A₃ et A₄ (Dunsford et Hutchison, 1953).

L'inhibition des hémagglutinines des graines peut être réalisée par les substances de groupes sanguins d'origine humaine et les sucres simples (Morgan et Watkins, 1953).

Les extraits de Fève agglutinent les globules rouges humains et animaux et le titre de l'agglutinine est très augmenté lorsqu'on utilise, au lieu d'eau physiologique, de la gomme-acacia.

L'extrait de *Vicia graminea* contient une agglutinine anti-N comparable à celle de l'isoagglutinine humaine (Ottenssooser et Silberschmidt, 1953).

Le pouvoir agglutinant des extraits de Pois et de Haricot à l'égard des globules rouges varie suivant les espèces animales, et il est possible, par la méthode de précipitation en milieu gélosé, de mettre en évidence, dans le sérum de lapin immunisé avec de tels extraits, des anticorps actifs contre eux. Il existe des différences antigéniques entre les divers extraits et des réactions croisées (Dujarric de la Rivière, Saint-Paul et Eyquem, 1953).

L'étude de l'agglutination de globules rouges d'humains et de différents animaux par des extraits de *Ricinus communis*, *Dolichos lablab*, *Vicia faba*, *Phaseolus lunatus*, a permis à Bird (1953), de les diviser en quatre groupes : 1° mouton, chèvre, buffle, bœuf, cheval et chien ; 2° poulet, pigeon ; 3° lapin, cobaye, homme des groupes B et O ; 4° homme du groupe A.

Avec un plus grand nombre d'extraits végétaux il a pu obtenir des résultats encore plus précis (1954).

Les graines de Soja (*Glycine soja*) contiennent une hémagglutinine active sur les globules rouges de lapin et de rat, mais non sur ceux de mouton et de veau. Il est possible de la préparer sous forme purifiée (Liener et Rose, 1953) et de préparer un immunosérum neutralisant. L'agglutinine de Soja titrant 1/128 à 4° est inactive à 37°.

Kabat, Heidelberger et Bezer (1947), par précipitation fractionnée avec le sulfate de soude, ont pu obtenir des préparations de ricine hémagglutinante et hautement toxique. Ces produits étaient, du point de vue des constantes physicochimiques et immunologiques, identiques à la ricine cristallisée, mais moins

toxiques qu'elle. La cristallisation permet d'obtenir les deux formes toxique et non toxique de la ricine. Il n'a pas été possible à Clarke (1954) de mettre en évidence des anti-héماغglutinines spécifiques pour la ricine, dans les immunsérums homologues.

Les *Champignons* possèdent également des agglutinines actives sur les globules rouges. Ont ainsi été étudiés : *Amanita solitaria* et *Amus* (Ford, 1906), *Agarius campestris* et *Boletus edulis* (Friedberger et Brossa, 1912). Plus récemment, Elo, Estola et Malmström (1951), sur 139 espèces de champignons, ont trouvé des propriétés agglutinantes chez 26 p. 100 : *Hygrophorus hypothejus* et *Psilocybe spadicea* sont surtout anti-A₁A₂ et B et un peu anti-O. *Marasmius oreades* est faiblement anti-B, *Amanita muscaria* surtout anti-A₂ et anti-O. Il existe des différences individuelles suivant les champignons.

Bernheimer et Farkas (1953), examinant le pouvoir agglutinant d'extraits de 70 espèces de champignons supérieurs (*Pezizales*, *Agaricales* et *Lycoperdals*), ont trouvé des hémolysines dans 6 espèces, et des héماغglutinines non spécifiques dans 15 espèces.

Clitocybe nebularis contient une agglutinine anti-A₁ et *Xylaria polymorpha*, une agglutinine anti-O (Tétrý, Sutton et Moullec, 1953).

Marasmius oreades possède une héماغglutinine active sur les globules rouges A, B et O, mais pas sur les globules B (Elo et Estola, 1952). L'augmentation de la température augmentait la spécificité de cette agglutinine.

Ajoutons qu'*Ulex europaeus* permet de distinguer les sujets sécréteurs des non-sécréteurs (Boyd et Shapleigh, 1954).



Nous avons étudié le pouvoir agglutinant d'une préparation normalisée de phytohéماغglutinine de *Phaseolus vulgaris* précipitée par l'alcool et desséchée au froid après dialyse contre l'eau distillée et congélation, vis-à-vis des globules rouges de l'homme et de diverses espèces animales.

Pour l'homme, l'étude des échantillons de 40 individus donne des titres agglutinants compris entre 1/1 000 et 1/8 000.

Chez le mouton, sur 32 animaux, les titres obtenus sont compris entre 1/32 et 1/2 000.

Parmi 101 bœufs étudiés, 27 ont les globules rouges inagglutinables par la phaséoline, 24 ont eu leurs globules rouges agglutinés à un titre inférieur à 1/16, et les autres à un titre inférieur à 1/64, ce qui semble indiquer la présence de deux catégories d'animaux différents, suivant que leurs globules rouges sont agglutinables ou non par la phytoagglutinine.

Chez le cheval, le titre de l'agglutination, étudié chez 56 indi-

vidus, est, au contraire, très élevé, étant en effet toujours supérieur à 1/1 000, compris en général entre 1/1 000 et 1/64 000. Nous avons fait des constatations analogues chez le *mulet* (15 animaux).

L'examen de 16 *lapins* a donné des titres compris entre 1/256 et 1/1 000, celui de 10 *souris* entre 1/256 et 1/1 000, de même que celui de 10 *rats*.

II. — RÔLE DES PHYTOHÉMAGGLUTININES DANS LES SYNDROMES HÉMOLYTIQUES.

L'action de ces substances a été étudiée en expérimentation, du fait de l'analogie que peuvent présenter les expériences réalisées, avec la pathogénie du favisme. Au cours de cette affection, Anicetta et Carcassi, étudiant 121 malades atteints de favisme, ont observé, chez 91 d'entre eux, une réaction directe de Coombs positive. Ce phénomène peut être explicable par un processus d'héماغglutination passive se produisant *in vivo* ou par une transformation antigénique des hématies provoquée par la phytoagglutinine. Les extraits de *Vicia faba* ont été utilisés pour obtenir un syndrome hémolytique (Greger et Gifford). Ces extraits sont agglutinants pour des globules rouges humains sans qu'il y ait augmentation de leur fragilité érythrocytaire. L'agglutinine peut être transférée de globule à globule et être obtenue par élution. Son action est intensifiée par adjonction de gomme acacia. Elle est inhibée au contraire par le sérum humain normal. La fraction responsable est une globuline gamma. Chez les lapins recevant, par voie intraveineuse, une suspension de globules rouges homologues, mis en contact avec des extraits de Fèves à des concentrations non agglutinantes, on voit apparaître une auto-héماغglutination (Schwartz-Tiene et Vullo).

Wasastjerna (1951), au cours de recherches sur l'anémie hémolytique expérimentale, a essayé des extraits de *Phaseolus vulgaris*. Il a injecté, par voie intraveineuse, 2 cobayes avec 0,1 à 0,2 ml par 100 g de poids d'un extrait titrant 1/2 400, et un autre animal avec 0,3 ml par 100 g de poids d'un extrait titrant 1/3 072. Il a obtenu une faible diminution du nombre des globules rouges pendant les deux jours suivant l'injection, avec retour à la normale au troisième jour et n'a pas constaté d'héماغglutination dans le sang de ces animaux. L'essai de production d'une anémie hémolytique expérimentale par ce moyen a donc échoué, quoiqu'on ne puisse éliminer absolument la possibilité d'une petite hémolyse. Des essais à des doses plus fortes n'ont pas réussi, les animaux n'ayant pu supporter les injections de volumes importants d'extrait. En combinant l'extrait avec la saponine ou la streptolysine, Wasastjerna n'a pas, non plus, obtenu d'agglutination,

l'effet hémolysant produit n'étant pas plus important que celui provoqué par la saponine ou la streptolysine seule.

Il pouvait être intéressant de rechercher la présence de phyto-agglutinines incomplètes dans l'extrait de différentes graines. Pour cela nous avons préparé des immunosérums par immunisation de lapin à l'aide d'extraits de graines homologues. Si on sensibilise les globules rouges humains par exemple à une dose égale au 1/10 de la dose agglutinante, on peut révéler la fixation sur les globules rouges de substances dont il est difficile de savoir si elles représentent des agglutinines incomplètes ou des antigènes révélés par le processus de l'hémagglutination passive. Cette fixation est mise en évidence à l'aide d'immunosérum de lapin homologue dilué du 1/2 au 1/10 000. Pour *Vicia faba*, l'examen de 7 lapins immunisés a mis en évidence une hémagglutination seconde des G. R. sensibilisés jusqu'à une dilution de 1/5 000 pour 5 d'entre eux et 1/512 pour les 2 autres. Pour *Pisum sativum*, l'agglutination seconde atteint la dilution de 1/128 pour 3 sérums et 1/512 pour 2 autres.

L'agglutination de G. R. trypsinisés montre une augmentation de l'agglutinabilité. Ceci permet de penser qu'il y a association des deux phénomènes : hémagglutination passive et présence d'une hémagglutinine incomplète.

La mise en évidence de ce phénomène de fixation de l'extrait végétal à une dose non agglutinante sur les globules rouges pouvait permettre d'étudier un syndrome hémolytique expérimental faisant intervenir l'hémagglutination passive. Nous avons réalisé nos expériences chez la souris, suivant deux protocoles.

Chez des souris sélectionnées homogènes pesant 16 à 19 g après examen hématologique préalable, nous avons pratiqué, par ponction des sinus caverneux, un prélèvement de 0,6 ml de sang par souris. Après une nouvelle numération, on injecte dans la veine de la queue de la souris une suspension de globules rouges homologues, à la dose approximative de 1 ml suivant les animaux, globules rouges soit simplement lavés, soit mis en contact avec une concentration non agglutinante de phaséoline. Les animaux sont séparés en quatre groupes : les uns reçoivent des G. R. lavés, d'autres reçoivent des globules rouges mis en contact avec la phaséoline. L'un de ces groupes a reçu, quarante minutes après, du sérum de lapin anti-phaséoline, dont les hétéro-agglutinines avaient été absorbées. Un autre groupe reçoit du sérum de lapin normal. Un dernier groupe reçoit de la phaséoline seule.

On observe paradoxalement que, si on pratique une numération globulaire trois heures et demie après, le sérum de lapin normal exerce un effet protecteur. En effet, la phaséoline seule entraîne, au bout de trois heures et demie, une perte globulaire de 1 600 000 G. R./mm³ pour chaque animal, alors que le sérum

de lapin normal diminue l'importance de cette perte globulaire de telle manière qu'elle n'est que de 220 000 G. R./mm³. Elle est au contraire, de 1 600 000 en présence de sérum de lapin antiphaséoline. On peut penser qu'il y a, dans ce dernier cas, association de deux processus, l'un de protection due à la fraction existant dans le sérum normal, et l'autre de sensibilisation due au sérum antiphaséoline.

Dans un autre temps, nous avons réalisé l'expérience, non pas en utilisant le processus d'immunisation passive, mais en expérimentant sur des animaux immunisés activement, notamment vis-à-vis de la phaséoline. Les résultats sont, dans ce cas, encore plus évidents.

Si on s'adresse à des souris immunisées au préalable, à l'aide de six injections de phaséoline, on observe que l'élimination des globules rouges traités par la phaséoline, dans les mêmes conditions que précédemment, se fait plus rapidement que chez les souris normales.

La même expérience peut être réalisée chez les lapins, immunisés ou non, à l'aide de phaséoline. L'élimination des globules rouges injectés est complète, six heures après l'injection, chez les animaux immunisés, alors qu'elle ne l'est qu'au bout de seize heures chez les animaux témoins.

On peut également réaliser une expérience analogue chez des lapins normaux, en injectant des globules rouges sensibilisés par une phytoagglutinine extraite de *Pisum sativum*. En pratiquant

TABLEAU II. — Hémolyse *in vivo* de G. R. sensibilisés par une phytoagglutinine de *Pisum sativum*.

		LAPINS EN EXPERIENCE	LAPINS TEMOINS
	Numeration préalable	4.950.000	5.100.000
T.O	Saignée	25 ml	25 ml
3h.30	2ème numération	4.500.000	4.900.000
5h.	perfusion individuelle de G.R. sensibilisés	45 ml	45 ml
5h.10	injection I.V. sur lapin anti-pois	5 ml	0
6h.	3è numération	4.900.000 : 5 millions	5.900.000
9h.	4è numération	4.500.000 Hématurie : mort	5.340.000
24h.	5è numération	4.600.000 : 50%	4.800.000 survie 100%
		Immunisation passive	Témoins

une injection de sérum de lapin anti-Pois, on constate que les lapins témoins survivent tous, alors que 50 p. 100 des lapins présentant une immunisation meurent avec hématurie (tableau II).

On peut donc penser que les phénomènes d'héماغglutination passive jouent dans les anémies hémolytiques un rôle analogue à celui qui peut intervenir au cours du favisme.

Chez les animaux qui ont été immunisés activement, le syndrome présenté pourrait être confondu avec celui dû à des auto-anticorps. On peut donc soutenir que le caractère d'un auto-anticorps ne peut être affirmé que s'il est actif vis-à-vis de composants antigéniques génétiquement déterminés.

En résumé, les phytohéماغglutinines sont, pour certaines d'entre elles, spécifiques des antigènes érythrocytaires humains A, B, H, ou N. Elles contribuent ainsi à déterminer les antigènes érythrocytaires existant chez les animaux. Elles peuvent se présenter sous forme incomplète révélable par la réaction de Coombs. Leur utilisation permet de réaliser un syndrome hémolytique expérimental attribuable à un processus d'héماغglutination passive chez les animaux immunisés activement ou passivement.

BIBLIOGRAPHIE

- G. W. G. BIRD. *Nature*, 1952, **170**, 674.
 G. W. G. BIRD. *Current Sci.*, 1953, **21**, 195.
 G. W. G. BIRD. *Brit. J. exp. Path.*, 1954, **35**, 252.
 G. W. G. BIRD. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 519.
 W. C. BOYD et R. M. REGUERA. *J. Immunol.*, 1949, **62**, 333.
 W. C. BOYD. *Fed. Proceed.*, 1952, **11**, 462.
 W. C. BOYD. *J. Immunol.*, 1950, **65**, 281.
 W. C. BOYD et E. SHAPLEIGH. *J. Lab. clin. Med.*, 1954, 235.
 P. CAZAL et M. LALAURIE. *Acta Haematol.*, 1952, **8**, 73.
 R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, M. SAINT-PAUL et A. EYQUEM. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 211 et 1955, **240**, 576.
 I. DUNS福德 et A. M. HUTCHISON. *Vox Sanguinis*, 1953, n° 1-2, 6.
 J. ELO, E. ESTOLA et N. MALSMTRÖM. *Ann. Med. exp. Biol. fenniae*, 1951, **5**, 297.
 GRUBB. *Acta pathol. mic. Scand.*, 1949, **84**, 20.
 W. GREGER et H. HOUGHTON GIFFORD. *Blood*, 1952, **7**, n° 7.
 KOBERT. *Beitr. Z. Kenntn. veget. Häماغglutinine. Landwirtschaft. Versuchsstat. Berlin, Parey*, 1913, **79**, 1.
 R. KOULUMIES. *Ann. Med. exp. Biol. fenniae*, 1949, **27**, 20 ; 1949, **27**, 185.
 M. KRÜPE. *Z. Hyg.*, 1953, **136**, 200.
 K. LANDSTEINER. *The Specificity of Serological Reactions*. Harvard University Press. Cambridge, Mass., 1947, 310 pages.
 J. G. LI et E. E. OSGOOD. *Blood*, 1949, **4**, 670.
 H. MARCUSSEON-BEGUN. *Z. Immun. Forsch.*, 1926, **45**, 49.

- J. MUNTER. *Ann. Med. exp. Biol. fenniae*, 1949, **27**, 12.
W. T. MORGAN et W. M. WATKINS. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 94.
F. OTTENSOOSER et K. SILBERSCHMIDT. *Nature*, 1953, **172**, 914.
W. PUNIN. *Z. Naturf.*, 1952, **7 b**, 48.
K. RENKONEN. *Ann. Med. exp. Biol. fenniae*, 1948, **26** ; 1950, **28**, 45.
A. TETRY, E. SUTTON et J. MOULLEC. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 1566 ;
1954, **298**, 277.

Pour une bibliographie plus complète, se reporter à la Thèse de M^{me} Mas-Baylac, 1955. Fac. Médecine. Paris.

Les graines étudiées ont été aimablement fournies par la Société Vilmorin-Andrieux.

FIXATION ET TRANSPORT DES ANTIBIOTIQUES PAR LES HÉMATIES

par R. SEIGNEURIN, M.-L. ACHARD et R. MAGNIN (*).

*(Ecole de plein exercice de Médecine et de Pharmacie
de l'Université de Grenoble. Laboratoire de Microbiologie)*

Introduction.

Le rôle des hématies dans la fixation et le transport des produits d'élaboration des microbes est connu depuis longtemps, et plusieurs réactions de diagnostic sérologique de certaines affections microbiennes ou virales utilisent cette propriété d'absorption des hématies.

Il est un aspect connexe de ce phénomène sur lequel il ne nous semble pas que l'on ait l'habitude d'insister : c'est la propriété qu'ont les hématies de fixer, de mettre en réserve et de transporter les antibiotiques.

Notre but, dans ce court mémoire, est de montrer le rôle des hématies dans la fixation de l'érythromycine, de la terramycine et de l'auroéomycine, et d'envisager les applications pratiques qui pourraient en résulter.

Historique.

Sans entrer dans la relation des nombreux travaux relatifs à la fixation et l'absorption des substances minérales ou organiques sur les hématies, nous n'envisagerons ici que ceux ayant trait à la fixation des microbes ou de leurs produits d'élaboration, ainsi que des substances qui leur sont antagonistes.

Il semble, à ce point de vue, que Dujarric de la Rivière et Kossovitch, en 1927 [1], et Sbarsky, en 1926 [2], aient été les premiers à signaler la faculté qu'ont les hématies d'absorber et de fixer les toxines microbiennes [3]. Ils ont montré que les globules rouges absorbent la toxine diphtérique et que l'anatoxine tétanique, fixée sur les hématies, préserve celles-ci de l'action de la toxine tétanique [4].

Brauner et Sauru [5] constatent en 1931 le pouvoir absorbant

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 mars 1955.

des hématies de lapin normal à l'égard de certains microbes, et, en 1933 [6], à l'égard de certains sérums.

Aucune application pratique de ces phénomènes ne fut envisagée jusqu'à ce que Hirst [7], puis Mac Clelland et Hare [8], pratiquant des cultures de virus grippal dans l'œuf de poule incubé, eussent constaté et démontré l'absorption sélective du virus grippal par les hématies. Cette découverte fut le point de départ d'une méthode de diagnostic de la grippe, par agglutination des hématies, que Lépine, Sautter et Reinié (1946) ont bien mise au point [9]. Reh, Armangué, Novel et Dédé (1944) ont confirmé l'absorption de l'anatoxine diphtérique *in vitro* sur les hématies [10].

La fixation des sulfamides sur les hématies fut étudiée en 1943 par Heinemann [11], qui montra que cette fixation est instantanée et que le transfert peut se faire aussi bien dans le sens hématies-solution, que solution-hématies.

Glasko, Wolff et Dill, en 1949 [12], ont recherché l'absorption par les hématies, du chloramphénicol, de son dérivé d'hydrolyse et de son dérivé glycuronidé. Il ressort de leurs expériences que le chloramphénicol et son dérivé d'hydrolyse s'adsorbent sur les globules rouges qui peuvent ainsi constituer un réservoir d'antibiotique.

Recherchant des substances retardant l'élimination de la pénicilline au cours de traitements par cet antibiotique, afin de réduire le plus possible le nombre d'injections journalières, Heitzmann [13], en 1949, fut amené à injecter des mélanges de pénicilline et de sang (sang citraté ou globules en suspension dans l'eau physiologique) : il constata que le retard d'élimination est de l'ordre de huit à dix heures, ce qui tend à prouver que les globules se comportent comme un réservoir libérant progressivement l'antibiotique fixé sur eux (adsorption réversible).

Enfin, Seigneurin, reprenant en 1949 cette question en ce qui concerne la pénicilline [14], arrive aux conclusions suivantes :

1° Les hématies de mouton ou de bœuf, soigneusement déplasmatisées, mises *in vitro* en présence d'une solution de pénicilline absorbent la pénicilline : cette absorption est immédiate.

2° Chez les malades en traitement, les hématies du sang circulant ne fixent pas la pénicilline. Le maintien au delà de trois heures et jusqu'à douze ou vingt-quatre heures d'une pénicillémie appréciable provient de ce que, lors du mélange initial (dans la seringue) du sang et de la pénicilline, celle-ci a été partiellement fixée *in vitro*, par les globules rouges qui la restituent ensuite progressivement au plasma circulant.

3° L'injection d'hématies déplasmatisées et pénicillinées à des lapins provoque l'apparition, dans le sérum de ces derniers, d'un certain taux de pénicilline se prolongeant sept à vingt heures

après l'injection. Les hématies donc sont capables *in vitro* de fixer ou d'adsorber la pénicilline, et chose remarquable, de la restituer au sang circulant de l'individu chez lequel on les injecte, et de maintenir ainsi chez lui pendant six à vingt heures un taux antibiotique de pénicilline. Il y a là une nouvelle possibilité thérapeutique qui paraît devoir être intéressante, par transfusion d'hématies, ou de sang conservé, pénicillinés.

Expérimentation.

Nous étudions, *in vitro*, l'adsorption par les hématies humaines de trois antibiotiques : érythromycine, terramycine et auréomycine, et leur transfert consécutif des globules à la solution qui les baigne (plasma, eau physiologique).

I. — ADSORPTION.

1° **PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.** — A. *Préparation des globules rouges.* — Les hématies humaines O Rh négatif (sang recueilli sur solution citratée glucosée en vue de la transfusion) sont lavées à l'eau physiologique pour les débarrasser de toute trace de plasma (centrifugées trois fois, pendant dix minutes à 3 600 tours/minute). Le liquide de lavage est retiré stérilement au moyen d'une pipette Pasteur à boule. Elles sont ensuite maintenues vingt-quatre heures à +4°.

B. *Préparation des solutions d'antibiotiques.* — Elles sont faites dans l'eau physiologique à raison de 1 mg d'antibiotique par centimètre cube d'eau.

Erythromycine : la solution est préparée à partir de l'érythromycine en poudre.

Terramycine : utilisation du chlorydrate de terramycine additionné de glycinate de sodium, mélange délivré pour injection intraveineuse.

Auréomycine : comme pour la terramycine.

C. *Sensibilisation des hématies aux antibiotiques.* — Les hématies sont mises en présence de l'antibiotique à des concentrations différentes que nous verrons plus loin, dans des tubes stériles. Le mélange est mis à la glacière à 4° pendant une, deux, vingt-quatre, quarante-huit heures. On constate que l'adsorption est immédiate. Pour l'érythromycine, nous avons poursuivi l'étude pendant neuf jours, les résultats furent les mêmes.

D. *Etude du pouvoir antibiotique des hématies sensibilisées.* — Sorties de la glacière, elles sont centrifugées et lavées à l'eau physiologique trois fois. Le pouvoir antibiotique a été déterminé à l'aide d'une souche de staphylocoque doré, ensemencée à raison de 1 million de germes de vingt-quatre heures sur boîte de Petri

contenant la gélose spéciale délivrée par l'Institut Pasteur. De petites cupules de 6 mm de diamètre y sont faites à l'emporte-pièce stérile, et on y dépose 1/10 de centimètre cube de purée globulaire, lavée comme indiqué ci-dessus. Après vingt-quatre heures d'étuve, on mesure le diamètre des zones d'inhibition autour des cupules. Le témoin de sensibilité est une pastille de l'antibiotique correspondant. Les résultats obtenus en ce qui concerne l'érythromycine ont été corroborés par la méthode de diffusion linéaire en tubes capillaires selon Velu [15] : la gélose ensemencée de staphylocoques est répartie dans des tubes de diamètre faible. Le produit dont on veut étudier le pouvoir antibiotique est introduit à la surface de la gélose après solidification de cette dernière. Après incubation de vingt-quatre heures à 37°, on lit les hauteurs d'inhibition.

2° RÉSULTATS (méthode sur boîte de Petri).

Erythromycine :

Quantité en mg d'érythromycine mise en contact avec 1 cm ³ de globules pendant 24 heures à + 4°	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Diamètre en mm des zones d'inhibition produites par les globules lavés	14	19	23	24	22

Auréomycine :

Quantité en mg d'auréomycine mise en contact avec 1 cm ³ de globules pendant 24 heures à + 4°	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Diamètre en mm des zones d'inhibition .	16	18	22	25	27

Terramycine :

Quantité en mg de terramycine mise en contact avec 1 cm ³ de globules pendant 24 heures à + 4°	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Diamètre en mm des zones d'inhibition .	16	18	23	23	25

CONCLUSIONS. — 1° La fixation de l'auréomycine, de l'érythromycine et de la terramycine sur les hématies est immédiate et totale. Les doses d'auréomycine fixées semblent toutefois plus faibles que celles des autres antibiotiques.

2° Il semble que la quantité d'antibiotique fixée sur les hématies ne soit pas proportionnelle à la concentration de la solution, mais qu'il y ait un seuil d'absorption.

II. — TRANSFERT DE L'ANTIBIOTIQUE FIXÉ SUR LES GLOBULES A LA SOLUTION QUI LES BAIGNE.

Pour étudier ce transfert, nous avons d'abord sensibilisé les globules (1 cm³ de purée globulaire + 0,5 mg d'antibiotique : séjour de vingt-quatre heures à +4°); nous les avons ensuite lavés trois fois à l'eau physiologique pour les débarrasser de toute trace externe d'antibiotique; puis, nous les avons mis en suspension dans du plasma (1 cm³ de globules sensibilisés et lavés, dans 1 cm³ de plasma).

Le tout est mis à l'étuve à 37° pendant des temps différents. Après centrifugation de dix minutes à 3 600 tours/minute, pour éliminer les globules, nous avons étudié le pouvoir antibiotique du plasma surnageant par la même méthode que ci-dessus en cupules sur boîtes de Petri.

Erythromycine :

Temps en heures de contact globules sensibilisés-plasma à + 37° . . .	1	2	6	24	48	96
Diamètre en mm des zones d'inhibition	27	25	21	25	26	29

Terramycine :

Temps en heures de contact globules sensibilisés-plasma à + 37° . . .	1	2	5	25	48	72
Diamètre en mm des zones d'inhibition	37	32	29	29	31	Faible.

Auréomycine :

Temps en heures de contact globules sensibilisés-plasma à + 37° . . .	1	2	6	24	48	96
Diamètre en mm des zones d'inhibition	25	22	21	17	10	0

CONCLUSIONS. — 1° L'antibiotique fixé sur les globules est capable de s'en détacher, dès qu'on remet ceux-ci en suspension dans du plasma : l'antibiotique passe dans le plasma, dès la première heure de contact.

2° Au cours des heures suivantes, il y a réadsorption sur l'hématie d'une partie de l'antibiotique diffusé dans le plasma.

Nous pensons qu'il pourrait être souhaitable, en certains cas thérapeutiques, d'associer l'antibiotique à des hématies iso-groupes, et de pratiquer une injection globale qui permettrait d'utiliser l'effet-retard du sang, en renforçant les défenses du malade.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSOVITCH. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 373.
- [2] B. SBARSKY. *Biochem. Z.* 1926, **169**, 113.
- [3] et [4] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSOVITCH. *C. R. Soc. Biol.*, 1930 à 1938. *Ces Annales*, 1930, **45**, 107 ; 1933, **51**, 149.
- [5] R. BRAUNER et E. SAURU. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 859.
- [6] R. BRAUNER et E. SAURU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 312.
- [7] G. K. HIRST. *Science*, 1941, **94**, 22.
- [8] MAC CLELLAND et H. HARE. *Canad. publ. Health J.*, 1941, **32**, 530.
- [9] P. LÉPINE, V. SAUTTER et REINIÉ. *Ces Annales*, 1946, **72**, 523.
- [10] Th. REH, M. ARMANGUÉ, E. NOVEL et O. DÉDIÉ. *Revue suisse Path. Bactériol.*, 1944, **7**, 481.
- [11] M. HEINEMANN. *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 39.
- [12] A. J. GLASKO, L. M. WOLFF et W. A. DILL. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1949, **72**, 602.
- [13] HEITZMANN. *Ann. Biol. clin.*, 1949, n^{os} 1-2, 44.
- [14] R. SEIGNEURIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1215.
- [15] H. VELU et M. CRAIPEAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 730.

**ACTION CYTOPATHOGÈNE DES TROIS PROTOTYPES
DE VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE *IN VITRO*
SUR LES TISSUS
DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE SINGES
D'AFRIQUE CENTRALE.
NON RÉCEPTIVITÉ DES TISSUS
DE CERTAINS ANIMAUX**

par ALEXANDRE JEZIEFSKI (*).

*(Laboratoire Vétérinaire de l'I. N. E. A. C., Gabu, Congo Belge
et Service des Virus, Institut Pasteur, Paris)*

L'objet de la présente étude est de rendre compte de la continuation de nos travaux [1] ayant trait à l'étude de la possibilité d'employer, pour la culture du virus poliomyélitique, les tissus de différentes espèces de singes vivant dans les grandes forêts équatoriales de l'Ituri, Congo Belge, et d'exposer les résultats des recherches se rapportant aux essais de culture des virus sur les tissus de différents animaux autres que les singes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Pour les cultures nous avons utilisé les tissus testiculaires, ganglionnaires, de la rate, du rein et du poumon provenant de différentes espèces de singes, ainsi que d'autres animaux capturés ou abattus. Nous avons également employé les tissus placentaires humains et les tissus musculaires d'avorton. De plus, nous avons mis en culture des fragments de muscles pectoraux prélevés sur des embryons de singes tués. Tous ces fragments de tissus étaient prélevés aussitôt l'animal abattu et conservés dans le liquide de Hanks, Ringer ou en milieu Enders. De deux à douze heures après ce prélèvement ces tissus étaient alors mis en culture. En général, nous pouvions constater que ces cultures se développaient très rapidement, dès le quatrième jour, pour autant que ces tissus provenaient d'un embryon ou d'un animal jeune. Si l'animal était

(*) Manuscrit reçu le 10 janvier 1955.

plus âgé, l'introduction du virus n'avait lieu qu'à partir du huitième jour, c'est-à-dire après deux changements de milieu.

Les tissus ont été cultivés, en général, dans le milieu d'Enders contenant 90 p. 100 de liquide amniotique (ou allantoïque), 5 p. 100 de sérum de cheval et 5 p. 100 d'extrait embryonnaire bovin (1) [2, 3, 4, 5].

Dans chaque cas nous avons obtenu des cultures de fibroblastes et d'épithélium (tissu pulmonaire et rénal). Pour éprouver la sensibilité de ces cultures au virus, nous avons utilisé les trois souches de virus poliomyélique Mahoney (type I), MEF1 (type II) et Saukett (type III) provenant du laboratoire du Dr J. Salk et cédées au laboratoire de l'I. N. E. A. C. à Gabu, Congo Belge, grâce à l'obligeance du Service des Virus de l'Institut Pasteur de Paris.

Au moment où les tissus étaient bien développés, nous avons retiré le milieu et introduit 11 gouttes de suspension du virus contenant 1 000 doses infectantes et laissé pendant trente minutes environ à la température ambiante.

Après ce délai, le milieu est ajouté ; on ferme les tubes avec un bouchon de caoutchouc et on les place dans l'appareil à tubes roulants.

Les observations sont faites après l'expiration d'un délai de seize heures et durent jusqu'à sept jours.

Nous avons comparé la réceptivité de l'animal au virus de la poliomyélite inoculé par voie intracérébrale à la sensibilité des tissus du même animal cultivés *in vitro*. Cette comparaison était faite sur les singes *Cercopithecus lhoesti* Sclater, *Cercopithecus hamlyni* Pocock, *Cynocephalus papio*, ainsi que sur un lémurien, *Galago*.

Au cours de ces expériences nous avons essayé de trouver un animal autre que le singe dont les tissus seraient sensibles à l'action destructrice du virus de la poliomyélite, ce qui pourrait permettre la production massive du virus.

(1) Il faut souligner que les découvertes sur la multiplication du virus de la poliomyélite *in vitro* sur divers tissus (humains et de singes) faites par John F. Enders, Thomas H. Weller et Frederick C. Robbins à l'Hôpital des Enfants à Boston (U. S. A.), ainsi que celles de Joseph L. Melnick, J. Salk, Sabin, Helper, Gear, de Lépine et Barski, ont permis la production massive du virus de la poliomyélite, production qui sert actuellement à la préparation d'un vaccin antipoliomyélique formolé.

Le milieu Malherbe [2] est préférable ; en effet, le liquide amniotique provoque le développement des cellules claires et protège la culture contre la dégénérescence, tandis que le liquide allantoïque a tendance à provoquer une dégénérescence rapide de la culture et détermine des granulations cellulaires.

Différents tissus d'autres animaux de laboratoire ainsi que ceux de certains animaux sauvages ont été mis en culture afin d'en rechercher la sensibilité au virus. Ces essais étaient faits non seulement sur les premières générations cellulaires, mais également sur les deuxièmes après repiquage, ainsi que sur des cultures doubles (association de tissus sensibles et de tissus insensibles au virus). Enfin, des cultures mixtes étaient préparées avec des tissus pulmonaires, ceux-ci donnant des cellules fibroblastiques et des cellules épithéliales.

Les virus étaient introduits vers le huitième jour de culture et les observations étaient poursuivies pendant sept jours. La spécificité de l'effet cytopathogène était vérifiée sur des cultures parallèles où le virus était neutralisé avec des sérums spécifiques.

Nos essais sur les tissus autres que ceux des singes étaient faits sur les tissus testiculaires, ganglionnaires, de la rate et du poumon des 14 animaux suivants : mouton, chèvre, chat, civette, genette, serval, rat de brousse, caméléon, tortue terrestre, tortue aquatique (Lac Albert), lézard, pangolin *Manis smutia gigantea*, pangolin *Manis tricuspis* et éléphant.

Toutefois, chez l'éléphant, nous avons utilisé en outre les tissus du rein et de la surrénale.

D'autre part, nous avons inoculé avec les souches Mahoney, MEFl et Saukett, par voie intracérébrale, les animaux suivants : serval, rat de brousse, pangolin. Les résultats ont été négatifs.

RÉSULTATS.

Nous avons constaté que le tissu pulmonaire des singes est le plus sensible à l'action cytopathogène du virus de la poliomyélite ; le tissu ganglionnaire et celui de la rate des singes sont aussi très sensibles à cette action, mais le tissu testiculaire n'est détruit que partiellement : 70 à 80 p. 100. Le tissu musculaire provenant d'embryon de singe est particulièrement sensible et la virulence des souches augmente par passages successifs sur ces tissus. Nous avons observé que les passages rapides sur les tissus testiculaires provoquaient la diminution de l'action cytopathogène de telle façon, qu'après douze passages, 20 p. 100 à 30 p. 100 seulement des cellules fibroblastiques étaient détruites.

Ces observations ont été faites sur les tissus testiculaires des singes suivants : *Colobus abyssinicus*, *Colobus badius* et *Colobus angolensis*, quel que soit l'âge de l'animal (2).

D'autre part, nous avons constaté que dans aucun cas la destruc-

(2) L'atténuation des trois types de virus poliomyélitique a été observée sur les tissus des singes, *Colobus abyssinicus*, *Colobus badius* et *Colobus angolensis*.

tion des cellules n'a lieu avec les tissus des 14 animaux, autres que les singes, précédemment énumérés.

CONCLUSIONS.

Les cellules fibroblastiques humaines provenant d'un placenta et des muscles d'un avorton sont sensibles à l'action des trois souches types du virus de la poliomyélite (tableau I). Cette sensi-

TABLEAU I.

TISSUS HUMAINS race noire	CROISSANCE des cellules	EFFET CYTOPATHOGENE en 3 jours		
		Type I	Type II	Type III
Placenta	Très bonne	+++	+++	+++
Avorton, tissu musculaire . .	Bonne	+++	+++	+++

bilité est la même que celle observée sur les tissus du chimpanzé, du *Colobus angolicus*, du *Cercocebus gallericus*, des *Cercopithecus* et du cynocéphale. Elle se manifeste par un effet cytopathogène qui est spécifique (tableau II).

TABLEAU II.

SINGES	CROISSANCE des cellules	EFFET CYTOPATHOGENE			SENSIBILITÉ à l'inoculation intracérébrale Paralysie Mort
		MAH. en jours	MEF1 en jours	SAUK. en jours	
Chimpanzé	Très bonne.	+++ 3	+++ 3	+++ 3	Non éprouvée.
<i>Colobus angolicus</i> . .	Très bonne.	+++ 3	+++ 3	+++ 3	Non éprouvée.
<i>Cercopithecus lhoesti</i> .	Très bonne.	+++ 3	+++ 3	+++ 3	Mah. en 5 et 10 jours
<i>Cercocebus gallericus</i> .	Très bonne.	+++ 4	+++ 4	+++ 4	Mah. en 6 et 12 jours
<i>Cercopithecus hamlyni</i> Pocock	Très bonne.	+++ 3	+++ 3	+++ 3	Mah. en 4 et 7 jours
<i>Cynocephalus papio</i> .	Bonne.	+++ 3	+++ 3	+++ 3	Mah. en 7 et 14 jours
<i>Galago</i> (lémurien) singe nocturne . .	Très bonne.	0	0	0	MAH. MEF1 SAUK. 0 0 0

+++ , effet cytopathogène caractérisé par la destruction de la totalité des fibroblastes et des cellules épithéliales présents dans la culture.

Le titre du virus sur les tissus humains et de singes est établi par titrage sur tissu pulmonaire de singe. Le titre varie entre 10^{-4} et 10^{-5} .

Nous avons recherché sur cinq espèces de singes la sensibilité à la souche Mahoney par inoculations intracérébrales. Les lémuriens *Galago* inoculés avec les trois souches de virus séparément se sont montrés complètement réfractaires. Leurs tissus cultivés *in vitro* sont aussi entièrement insensibles au virus.

Ces expériences ont prouvé une fois de plus que seules les cellules des primates sont sensibles à l'action cytopathogène des trois types de virus de la poliomyélite.

Les animaux énumérés ci-dessus, autres que les singes, ont montré une absence totale de réceptivité cellulaire au virus de la poliomyélite et les cellules restées complètement insensibles au virus ont été incapables de le transmettre même passivement d'une culture à l'autre.

Nous tenons à remercier ici vivement M. Sladden, Directeur de la 5^e Direction Générale du Gouvernement Général à Léopoldville, Congo Belge, ainsi que M. Dubois, son successeur, et M. Matagne, de l'aide particulièrement bienveillante et de la compréhension pour les travaux scientifiques qu'ils nous ont constamment témoignées, ce qui a considérablement facilité nos recherches.

Nous remercions aussi très vivement la Direction générale de l'I. N. E. A. C.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BARSKI, A. JEZIERSKI et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1954, **86**, 243.
- [2] H. MALHERBE. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **86**, 124.
- [3] F. C. ROBBINS, T. H. WELLER et J. F. ENDERS. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 673.
- [4] J. F. ENDERS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 100.
- [5] G. BARSKI, P. DE SOUZA, V. MONACI, M. ENDO et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 576.
- [6] R. C. PARKER. *Methods of tissue culture*, 2^e édit., 1950.

LE VACCIN BCG ET LE HAMSTER

par ABELARDO SAENZ fils (*).

(Institut de Phthiologie
et Chaire de Clinique Phthiologique de Montevideo
[professeur F. D. GOMEZ])

La sensibilité au vaccin BCG et son innocuité furent soigneusement établies par Calmette et ses collaborateurs, chez les divers animaux de laboratoire qu'ils employèrent à l'époque. Leurs travaux à ce sujet sont définitifs.

Le BCG inoculé au cobaye, au lapin, au singe et aux bovidés est parfaitement bien toléré par ces animaux, même à des doses assez fortes et en employant diverses voies d'inoculation. Son efficacité ne laisse plus de doute vis-à-vis de l'infection bacillaire chez l'homme et chez l'animal.

En 1919, Hsien [1] propose d'employer en expérimentation animale, comme test biologique, un rongeur de la famille des *Cricetidae*, le hamster rayé (*Cricetus griseus*) ou hamster chinois « Tsang-shu ». La facilité de son acquisition, son coût relativement bas et son extrême fécondité devaient obligatoirement diffuser son emploi en Asie. La première inoculation du BCG au hamster (*C. griseus*) fut faite par Tung et Wong [2] en 1940. Ces deux auteurs montrent tout d'abord la sensibilité du hamster au bacille tuberculeux virulent, comme l'avaient fait auparavant Korns et Lu [3, 4, 5], en modifiant le procédé de Pickof [6] qui consiste à injecter une suspension contrôlée de bacilles sous la peau d'un animal, préalablement infiltrée avec une suspension de silice. Ils remplacent celle-ci dans leurs expériences par du kaolin.

Au cours de leurs recherches, qui visent essentiellement au diagnostic précoce de la tuberculose, ils inoculent par la technique qu'ils préconisent, deux lots de hamsters, le premier avec des souches virulentes humaines et bovines, le second avec du BCG, bacille aviaire et bacille paratuberculeux (*Mycobacterium smegmatis*). Ils font le bilan des résultats dans les deux groupes en comparant systématiquement les frottis, obtenus par étalement et coloration sur lame, de la matière caséuse formée sous la peau, au point d'inoculation.

(*) Manuscrit reçu le 10 janvier 1955.

Ils concluent que deux semaines après l'inoculation, on peut aisément déceler la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants chez les animaux inoculés avec des souches virulentes tuberculeuses humaines et bovines.

Par contre les hamsters inoculés avec du BCG, bacille aviaire et bacille paratuberculeux, s'avèrent négatifs à l'examen direct des frottis.

Tung et Wong dans leurs conclusions insistent sur l'intérêt que présente cet animal pour l'expérimentation, car il permet de séparer clairement les souches virulentes tuberculeuses des souches atténuées BCG, du bacille aviaire et des souches saprophytes de bacilles paratuberculeux.

Quelques années plus tard, P. Hauduroy et W. Rosset entreprennent une série de recherches sur le BCG. Ils l'inoculent à une autre variété de hamster, le hamster doré (*Mesocricetus auratus*), originaire de Syrie, introduit comme animal de laboratoire vers 1935 en Europe et aux Etats-Unis.

En janvier 1951 [7], ces deux auteurs présentent à l'Académie des Sciences de Paris une première note sur la sensibilité du hamster doré au BCG. Ils publient de nombreux articles sur ce sujet au cours de cette année [8 à 14].

Les conclusions de Hauduroy et coll. peuvent se résumer ainsi :

1° Le BCG inoculé par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale provoque chez le hamster une véritable « maladie expérimentale » qui le tue fatalement dans un délai qui varie suivant la dose inoculée et la voie d'introduction employée. Selon ces auteurs, 60 mg par voie sous-cutanée tuent en douze mois et en employant la voie péritonéale les survies s'échelonnent entre cinq mois avec 1 mg et deux mois et demi en employant 180 mg.

2° La mort survient en employant soit des cultures pures de vaccin, soit des bacilles provenant des organes de hamsters, inoculés préalablement et ensemencés, et même en employant des suspensions d'organes d'animaux inoculés. D'autre part, les pus des rares bécégites qui surviennent au cours de la vaccination intradermique déterminent chez ce rongeur le même effet. Le passage en série peut se faire, mais l'on ne parvient jamais à déterminer une augmentation de virulence du BCG en l'inoculant à un animal neuf, cobaye ou lapin.

3° Dans un travail publié en collaboration avec Nicod, ces mêmes auteurs dénombrent les lésions anatomopathologiques qu'ils homologuent à celles que l'on observe dans la tuberculose expérimentale du cobaye et chez le hamster inoculé avec un bacille humain ou bovin. Selon Hauduroy les lésions se situent dans le « poumon, le foie, les ganglions, les séreuses et la capsule fibreuse des reins ». Ils décrivent dans le péritoine

« de grosses masses gris jaunâtre, lobulées, friables, dans lesquelles la rate peut être totalement enfouie ». Dans leur premier travail, ils trouvent d'autre part celle-ci hypertrophiée. Du point de vue microscopique : foyers inflammatoires nodulaires formés de cellules épithélioïdes, de macrophages et de lymphocytes et même de cellules géantes type Langhans. Ces divers éléments subissent une fibrose évidente qui les encapsule ; ils apparaissent à la suite d'inoculations sous-cutanées et après inoculation intrapéritonéale. Du point de vue topographique : disposition irrégulière atypique, jamais de nécrose à caractère spécifique ni de caséification.

Ces publications devaient naturellement susciter de nombreux travaux. En 1952, au Japon, plusieurs auteurs étudient l'action du BCG chez le hamster par voie sous-cutanée. A. Imamura et Y. Kawamori [45] emploient 60 mg, T. Murohashi et K. Yagani-sawa [46], 10 mg par les voies sous-cutanée et intratesticulaire. Tous les animaux furent sacrifiés six semaines après l'inoculation.

Les conclusions de ces auteurs sont identiques : aucune lésion visible à l'autopsie, microscopiquement foyers atypiques de cellules épithélioïdes avec bacilles acido-alcoolo-résistants dans divers organes et positivité des ensemencements faits avec les organes des animaux inoculés. Oka [47] arrive aux mêmes résultats six mois après l'inoculation avec 10 mg de BCG par voie intramusculaire, mais il trouve en outre, à l'autopsie, des lésions minimales : un abcès au point d'inoculation et quelques granulations éparses dans la rate et les ganglions lymphatiques.

En 1953, K. Berger et F. Puntigam [48] étudient de nouveau la question et y apportent une interprétation nouvelle de la pathogénie. Ils répètent tout d'abord les expériences antérieures et inoculent avec du BCG, tant par voie sous-cutanée que par voie intrapéritonéale, un total de 55 hamsters. Comme l'avaient fait précédemment Hauduroy et coll., les doses employées par eux sont fortes ; ils injectent 75 mg, 100 mg, 150 mg et jusqu'à 225 mg.

Les résultats de l'autopsie révèlent que le BCG ne produit jamais de lésions comparables à celles causées par un bacille tuberculeux virulent humain ou bovin. Il y a des bacilles acido-alcoolo-résistants dans divers organes et du point de vue histologique des infiltrations atypiques de cellules blanches et épithélioïdes ; ces mêmes images se répètent d'ailleurs chez des hamsters inoculés avec du BCG mort tué par la chaleur, avec de la tuberculine BCG, et même avec de la tuberculine brute.

La mort survient par désintégration physico-chimique des corps bacillaires inoculés, ce qui produirait chez le hamster un état spécial d' « hypersensibilité ».

Tout récemment, F. van Deinse et M^{lle} F. Sénéchal [19] à l'Institut Pasteur de Paris, étudient de nouveau la question et publient les résultats obtenus en employant la voie intrapéritonéale. Ils inoculent du BCG vivant à des doses de 100 mg, 50 mg, 40 mg, 0,1 mg à divers groupes de hamsters. Ils voient les animaux mourir en général dans les mois qui suivent l'inoculation.

Les temps de survie trouvés sont assez variables d'un animal à l'autre, à l'inverse des observations de Hauduroy et coll., qui ont pu établir pour une même dose une moyenne échelonnée qui varie de cinq mois avec 1 mg à deux mois en employant 180 mg. Dans la rate, le foie, le poumon, nombreux bacilles acido-alcoolorésistants. L'examen macroscopique montre des adhérences multiples et en général une hypertrophie splénique, chez tous les animaux.

Chez un hamster inoculé avec 50 mg de BCG, van Deinse et Sénéchal décèlent l'existence de « quelques granulations sur une rate moyennement hypertrophiée ». Un autre animal inoculé avec 40 mg, sacrifié un an et trois mois après l'inoculation, montre « six granulations grises sur le poumon gauche » et un hamster qui reçoit 100 mg de BCG, sacrifié sept mois et demi après l'inoculation, « présente à l'autopsie une rate énorme portant des nodules caséeux et le poumon gauche parsemé de fines taches grises ; rien par ailleurs ». Du point de vue microscopique, ces deux auteurs rencontrent dans plusieurs organes diverses formations atypiques, réalisant des nappes histiocytaires ou épithélioïdes, qui bouleversent leur structure normale.

Comme la mort survient de même, bien que plus tardivement, chez les animaux inoculés avec des bacilles morts (40 mg et 100 mg) avec les mêmes lésions histologiques rencontrées chez les hamsters inoculés avec du BCG vivant, van Deinse et Sénéchal concluent que le BCG possède une action toxique pour le hamster hypersensible aux produits de désintégration bacillaire. La tuberculine purifiée agit de même. Les auteurs terminent en disant que le BCG n'est pas plus virulent pour le hamster que pour le cobaye.

L'importance du sujet, d'une part et, d'autre part, les résultats discordants publiés par les divers auteurs qui l'ont étudié, nous ont poussé, dès 1953, à établir une série de recherches pour déterminer l'action du BCG chez le hamster doré.

Nous avons employé dans nos diverses inoculations la souche BCG, délivrée par le dispensaire Calmette de Montevideo, dont on se sert pour la vaccination. Rapportée de Paris en 1925 par Moreau, elle est d'usage courant depuis de nombreuses années en Uruguay et au Brésil. Afin de procéder d'une manière uniforme, des ampoules de 10 cm³ contenant le vaccin administré

par voie buccale, furent toujours utilisées dans nos expériences, dans un délai qui correspond à celui de quarante-huit heures après leur livraison au public.

D'autre part, nous avons toujours travaillé au cours de nos recherches avec des hamsters adultes d'un poids de 110 à 130 g (1).

Notre étude commence en 1953 et nous décidons d'employer plusieurs voies d'inoculation pour éprouver l'action du BCG sur le hamster.

I. — INOCULATION PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE.

A. 100 MG DE BCG. — Sept hamsters reçoivent chacun 100 mg de BCG par voie intrapéritonéale.

Deux des animaux meurent onze et seize jours après l'inoculation sans aucun signe de maladie intercurrente qui aurait pu expliquer ce décès prématuré. Leur poids n'a pas varié. Dans les deux cas, à l'autopsie, on n'aperçoit à œil nu aucune lésion macroscopique spécifique visible.

La rate est normale, et l'on voit entre anse intestinale et anse, entre la grande courbure de l'estomac et l'extrémité splénique, de nombreux conglomerats de couleur blanche entourés de mailles de fibrine, formant ainsi de multiples adhérences qui relient entre eux plusieurs organes de la cavité abdominale. Les frottis montrent que ces adhérences sont dues en totalité à des colonies presque pures de BCG en grand nombre au milieu desquelles émergent quelques cellules blanches et des filaments de fibrine.

Chez les deux hamsters étaient visibles, mais sans grande augmentation de volume ni modification de consistance, les deux ganglions axillaires droit et gauche, de même que le ganglion inguinal externe droit. En général, chez ce rongeur, il faut dissocier légèrement dans l'aîne les pelotons de graisse qui se trouvent à cet endroit pour voir apparaître ce ganglion, bien que dans certains cas sa situation soit très superficielle.

Les frottis de tous les ganglions montrent la présence de bacilles acido-alcool-résistants ; de même dans le foie et surtout dans la rate, où ils sont nombreux. Les ensemencements de tous ces organes sur milieu de Löwenstein ont donné des colonies typiques de BCG. Du point de vue histologique, dans les deux

(1) Nous tenons à remercier les D^{rs} Siffries et Trenchi, de l'Institut de Biologie animale et le D^r A. Establier, délégué de l'UNESCO, à Montevideo, qui nous ont fourni les animaux nécessaires pour monter un élevage et entreprendre ce travail, et d'autre part le D^r J. J. Scandroglio, anatomo-pathologiste de l'Institut, qui a revu avec nous les principales préparations histologiques.

cas on voit dans le foie s'amorcer l'installation, d'une manière encore bien timide, de petits infiltrats lymphocytaires le long des espaces de Kiernan et çà et là quelques îlots, au milieu des cellules hépatiques, d'éléments épithélioïdes, allongés, à noyau d'un violet pâle. Dans la rate, de même, ébauche de nodules d'infiltration lymphocytaire et mobilisation conjonctive de cellules rondes et de monocytes. En plus, dans tous les organes examinés, grande congestion viscérale. Trois autres animaux meurent dans les délais suivants : trois mois et dix-huit jours, trois mois et quinze jours, trois mois et deux jours. Ils ont perdu la moitié à peu près de leur poids, l'amaigrissement étant très prononcé dans la dernière semaine surtout, où ils arrivent à peser 60 et 70 g.

Macroscopiquement, pas de lésion de type tuberculeux, uniquement des adhérences fibreuses fines entre les divers organes et, fait constant, une évidente hypertrophie splénique, les ganglions inguinaux et axillaires étant délimités et visibles, mais sans modifications.

Les frottis des différents organes révèlent des bacilles acido-alcool-résistants très nombreux dans la rate, nombreux dans le foie et les ganglions, on en trouve encore dans les adhérences, aucun dans le poumon.

Les ensemencements sont positifs. — Du point de vue microscopique, dans le foie, nodules de cellules épithélioïdes atypiques, isolés ou entourés d'infiltrats monocytaires et histiocytaires. Tout le long des espaces de Kiernan on rencontre bien souvent ce dernier aspect. Les mêmes images se répètent dans la rate, avec, en plus, des petits foyers de nécrose sans caractère spécifique. Chez le dernier animal de ce groupe (trois mois et deux jours) on observe une grande infiltration de cellules de la série blanche dans les deux secteurs hépatosplénique, une fibrose interstitielle évidente et une dégénérescence grasseuse dans le parenchyme hépatique.

Les deux derniers hamsters meurent quatre mois et demi et six mois après l'inoculation, en bonne santé apparente, avec un poids légèrement supérieur au poids initial (30 g de plus).

Nous retrouvons les mêmes faits qu'auparavant, mais l'hypertrophie splénique est beaucoup plus considérable, il y a au point d'inoculation chez le premier, un nid d'adhérences qui s'irradie à tout l'abdomen. Nombreux bacilles acido-alcool-résistants dans les frottis de celles-ci, de même que dans tous les autres secteurs (fig. 1). Dans les deux cas, les ganglions trachéo-bronchiques contiennent également des bacilles ; ils sont rares, mais ils existent maintenant dans les poumons.

Les ensemencements sont positifs et du point de vue histologique il faut noter dans le poumon une infiltration interstitielle

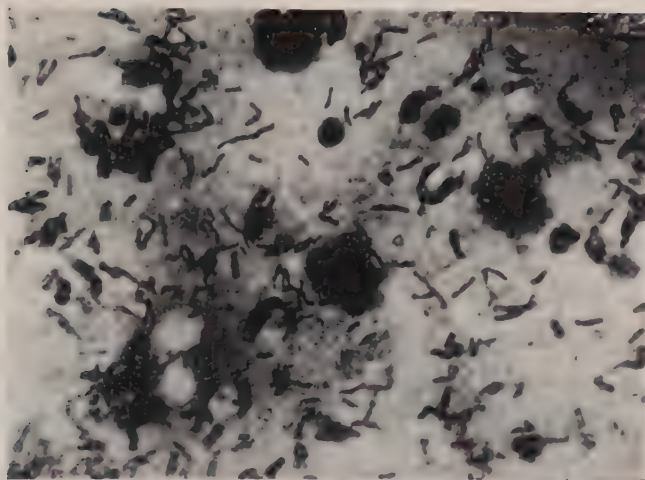


FIG. 1. — Frottis d'un nodule épiploïque d'un hamster inoculé avec 100 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale cinq mois auparavant. Nombreux bacilles acido-résistants.



FIG. 2. — Hamster inoculé avec 100 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale. Deux nodules reliés par un pont d'éléments lymphocytaires dans le foie.

lymphocytaire des parois alvéolaires ; dans le foie, une grande infiltration blanche disséminée, quelques rares infiltrats isolés (fig. 2) et une évidente prolifération des cellules de Kupffer, bandes

de fibrose importantes. De même, dans la rate, il y a une production fibreuse évidente, grande infiltration disséminée, l'aspect histologique normal de l'organe est à peine reconnaissable. Il faut noter par ailleurs que le sixième hamster est une femelle qui a mis bas, deux mois après l'inoculation, 6 petits qui se sont élevés en parfaite santé. Nous avons sacrifié l'un d'eux quinze jours après la naissance ; ses organes montrent des bacilles nombreux dans les frottis, sans aucune lésion macro- ou microscopique. Les cinq autres survivent encore.

B. 50 MG DE BCG. — Nous avons inoculé 6 hamsters qui reçoivent chacun 50 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale.

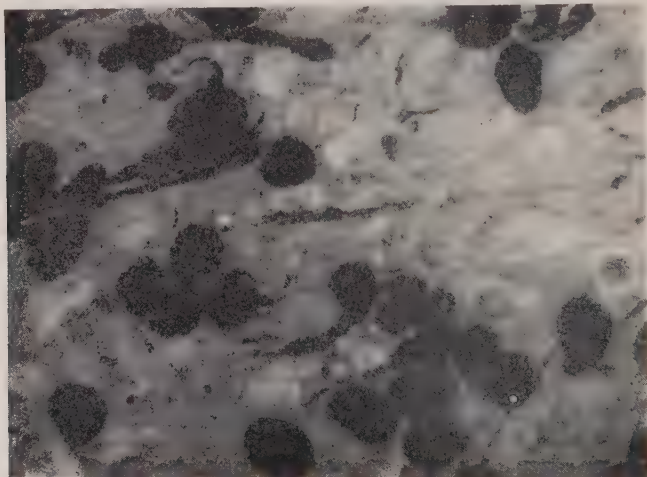


FIG. 3. — Frottis de la rate d'un hamster inoculé avec 50 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale cinq mois auparavant. Nombreux bacilles.

Deux succombent treize et seize jours après l'inoculation, présentant uniquement quelques adhérences et conglomérats qui fourmillent de bacilles acido-résistants, les ganglions inguinaux et axillaires sont visibles et d'aspect normal, les frottis adéno-hépto-spléniques sont tous positifs ; rien dans le poumon ; la rate est macroscopiquement normale.

Du point de vue histologique, mêmes images que chez les animaux inoculés avec 100 mg qui meurent précocement. Les quatre autres hamsters succombent dans les délais suivants : cinq mois et dix-sept jours ; cinq mois et douze jours, cinq mois et dix jours, quatre mois et demi après l'inoculation. Ils présentent uniquement à l'autopsie de la splénomégalie, les frottis et

cultures sont positifs (fig. 3 et 4). A l'examen histologique dans la rate, congestion et hémorragie interstitielle, ça et là fibrose ; les follicules de Malpighi ont par endroits totalement disparu ; à leur place, nodules de cellules épithélioïdes couronnés ou non de lymphocytes et monocytes. Quelques cellules géantes type Langhans, même avec vacuoles, solitaires au milieu d'une trame de fibrose et d'infiltration blanche. Le même aspect se trouve dans les ganglions (fig. 5).

Dans le foie (fig. 6), micronodules épithélioïdes ou lymphocytaires fréquents dans les espaces de Kiernan, souvent près des

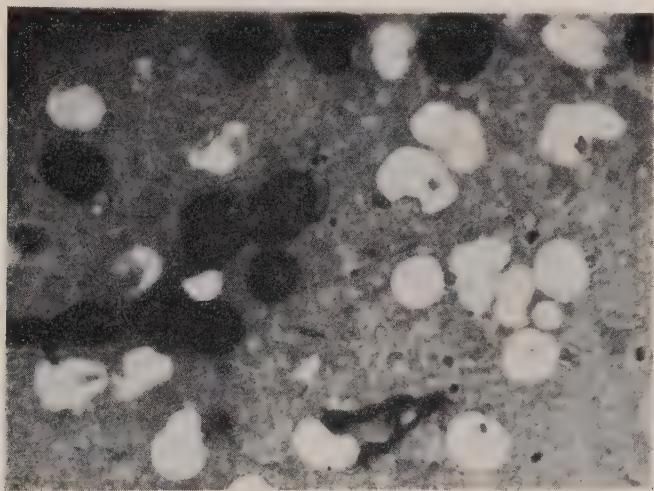


FIG. 4. — Frottis du foie d'un hamster inoculé avec 50 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale quatre mois auparavant. Quelques bacilles entre les cellules.

vaisseaux sanguins et parfois disséminés en plein parenchyme hépatique, qui demeure généralement de structure normale. On remarque parfois, ça et là, dans un champ microscopique, une fibrose des éléments épithélioïdes bien évidente. Dans le poumon, congestion et infiltration interstitielle lymphocytaire des parois alvéolaires.

C. 10 MG DE BCG. — Six hamsters reçoivent chacun 10 mg de BCG par voie intrapéritonéale. Un animal qui meurt au bout de trois mois et quinze jours est éliminé de notre étude, car son cadavre est entièrement dévoré par ses compagnons de cage. Des cinq restants, le premier meurt deux mois après l'inocula-

tion. Du point de vue macroscopique : rate normale, pas d'adhérences, on trouve des bacilles abondants dans les trois secteurs déjà connus. Du point de vue histologique, infiltration lymphohistiocytaire très disséminée du foie et de la rate, sans formation de nodules, fibrose interstitielle.

Les quatre autres meurent trois mois et quatorze jours, trois mois et dix-neuf jours, quatre mois, quatre mois et dix jours après l'inoculation ; chez tous, rate légèrement hypertrophiée, par d'adhérences, cultures positives. Présence de bacilles dans les trois secteurs adéno-hépatosplénique, la rate étant toujours l'organe le plus riche. Au point de vue histologique, mêmes

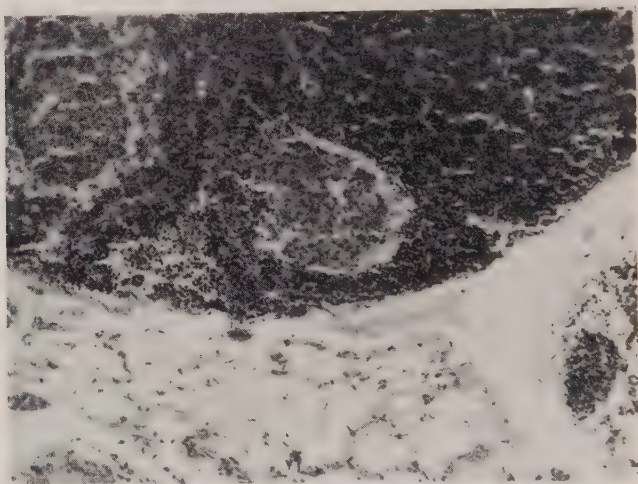


FIG. 5. — Ganglion d'un hamster inoculé avec 50 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale. On observe deux nodules épithélioïdes.

images déjà vues de nodules atypiques épithélioïdes et monolymphocytaires dans les organes, dans une gangue de fibrose interstitielle.

D. 1 MG DE BCG. — Quatre hamsters reçoivent chacun 1 mg de BCG par voie intrapéritonéale, ils meurent tous dans un délai de cinq mois et demi à six mois après l'inoculation. Rien d'anormal à l'autopsie, sauf une rate un peu agrandie. On trouve des bacilles en petit nombre dans tous les secteurs abdominaux, la rate, comme toujours, est caractérisée par une grande richesse bacillaire.

Du point de vue histologique, dans le foie, hémorragie et fibrose interstitielle ; ça et là, en très petit nombre, infiltrats

lymphocytaires et nids épithélioïdes avec très peu d'éléments ; de même dans la rate, qui est beaucoup plus touchée, on aperçoit quelques foyers de nécrose disséminés et une fibrose qui efface partiellement et repousse les follicules de Malpighi ; mêmes images de réaction cellulaire atypique que dans le foie.

Tels sont les faits observés par l'inoculation de BCG vivant en employant la voie intrapéritonéale ; nous y reviendrons plus loin.

Conjointement, à cette première série de recherches, nous avons étudié l'effet de l'introduction dans le péritoine du BCG mort tué par la chaleur. A cet égard, nous avons employé des

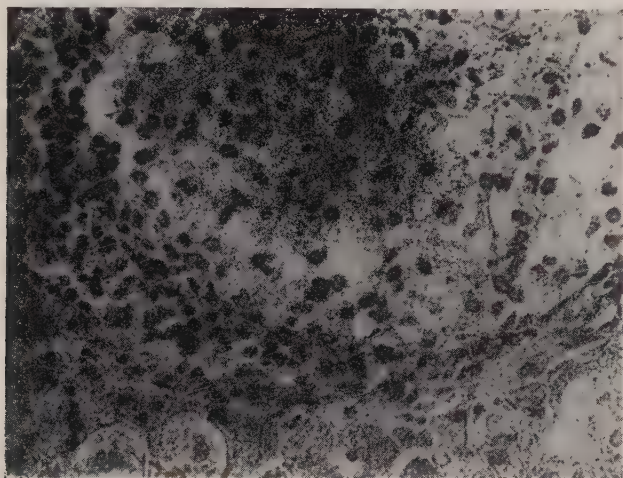


FIG. 6. — Foie de hamster inoculé avec 50 mg de BCG vivant par voie intrapéritonéale. On note trois zones : 1° cellules épithélioïdes ; 2° couronne de cellules lympho-monocytaires ; 3° cellules hépatiques.

doses faibles, six fois moindres, qu'avec le BCG vivant. D'une culture de BCG gardée au laboratoire, nous avons préparé des suspensions bien homogènes de 15 mg et de 5 mg de corps bacillaires morts dans 1 cm³ de sérum physiologique.

E. BCG MORT INOCULÉ PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE. — Quatre hamsters reçoivent ainsi 15 mg de BCG mort et quatre autres 5 mg. Nous les sacrifions en bonne santé six mois après l'inoculation. A l'autopsie, rien de particulier ; pas d'adhérences et la rate est normale. Les cultures témoins faites avec des fragments d'organes sont négatives.

Les frottis du foie, de la rate et des ganglions nous montrent

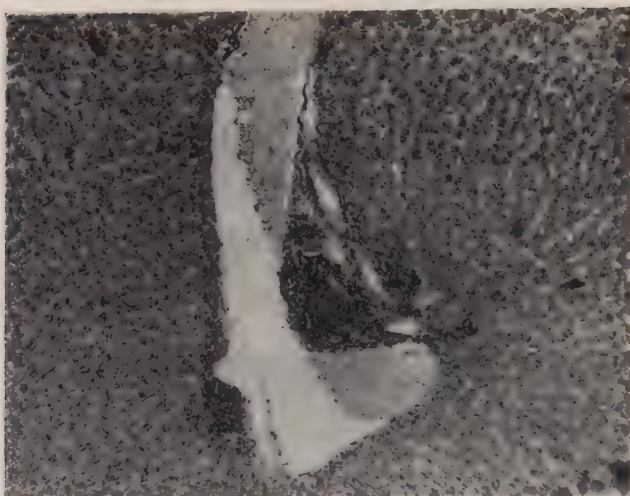


FIG. 7. — Hamster inoculé avec 15 mg de BCG mort.
Un autre aspect de la même réaction atypique.

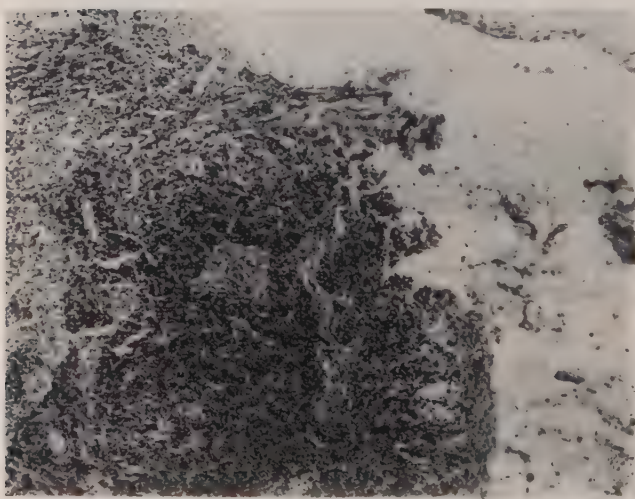


FIG. 8. — Ganglion inguinal d'un hamster inoculé avec 15 mg de BCG mort.
Nid d'éléments épithélioïdes entourés de lymphocytes et monocytes.

des bacilles acido-alcool-résistants. Du point de vue histologique, mêmes images atypiques de réaction cellulaire que nous avons rencontrées avec le BCG vivant (fig. 7, 8 et 9). Un fait,

pourtant, mérite d'être signalé : la précocité de la fibrose des éléments épithélioïdes, surtout dans le foie, qui forment des ponts et sont séparés par le parenchyme normal.

DISCUSSION. — Plusieurs faits méritent d'être considérés. Hauduroy et coll. trouvent des lésions macroscopiques à l'autopsie ; van Deinse et Sénéchal n'en trouvent point, généralement, bien

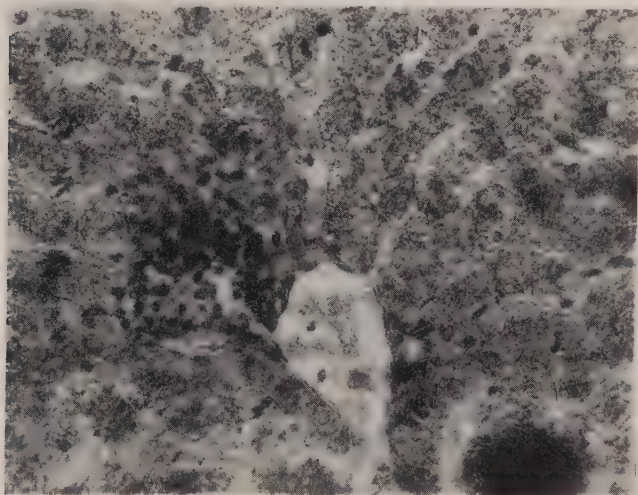


FIG. 9. — Hamster inoculé avec 5 mg de BCG mort par voie intrapéritonéale. Au milieu des cellules du parenchyme hépatique, nid d'éléments épithélioïdes entourés de lymphocytes.

qu'ils décrivent dans quelques cas quelques granulations isolées dans le poumon et des nodules dans la rate.

Il ressort de tout ce que nous avons exposé que nous n'avons jamais trouvé de lésions macroscopiques spécifiques tuberculeuses à l'autopsie des hamsters inoculés par le BCG en employant la voie péritonéale. Nous avons vu uniquement une hypertrophie splénique évidente et constante avec les doses fortes, discrète avec les doses inférieures à 10 mg. On observe un essaimage des bacilles, après leur introduction, dans tous les organes du système réticulo-endothélial de l'animal inoculé : ganglions, foie, rate et poumon (dans ce dernier, uniquement en employant des doses assez fortes). De tous, l'organe le plus sensible reste bien entendu la rate.

Les adhérences, comme nous l'avons vu, s'établissent au début entre les organes abdominaux et sont formées par des amas de

colonies de bacilles BCG en grand nombre, englobés par la réaction péritonéale et la fibrine. A mesure que le temps passe, il y a absorption des bacilles et après plusieurs mois il ne reste plus que le squelette fibreux des adhérences, qui s'appauvrissent progressivement en unités bacillaires. Comme Berger et Puntigam, van Deinse et Sénéchal l'ont déjà montré, nous confirmons de nouveau que le BCG tué par le chauffage produit chez le hamster les mêmes lésions histologiques atypiques que le BCG vivant.

Nous croyons, comme les autres auteurs, à une intoxication de l'animal produite par la désintégration des corps bacillaires. Hauduroy et coll. donnent des moyennes de survie pour les différentes doses employées. Sur ce point, van Deinse et Sénéchal obtiennent des temps plus irréguliers et plus variables. En étudiant de près les divers animaux inoculés par voie péritonéale, nous croyons pouvoir affirmer que, lorsqu'on inocule du BCG à un hamster par voie intrapéritonéale, il se produit tout d'abord une réaction générale de tout le système réticulo-endothélial (ganglions, foie, rate et, à fortes doses, poumons), réaction de défense qui tend à englober les corps bacillaires et à les éliminer. Trois éventualités peuvent dès lors se produire : l'animal meurt par effet toxique dans les premiers jours qui suivent l'inoculation (jusqu'au vingtième) sans que l'on puisse incriminer une maladie intercurrente. Nous en avons vu de nombreux cas en employant des doses différentes et, en parcourant les protocoles des expériences de van Deinse et Sénéchal, nous trouvons également des cas de mort prématurée sans cause apparente. L'animal meurt en peu de jours *sans changer de poids*. Du point de vue histologique, nous avons trouvé une congestion généralisée et l'on assiste au début à l'installation de quelques rares infiltrations lymphocytaires et de nids isolés de cellules épithélioïdes.

Si l'organisme résiste à ce premier choc, nous passons à la deuxième étape : c'est la fixation et la réabsorption tissulaire dans les organes des nombreux bacilles qu'ils hébergent. Nous voyons alors apparaître clairement les images histologiques atypiques de réaction cellulaire que nous avons décrites, au milieu d'une fibrose interstitielle qui commence. C'est à cette époque que, pour une même dose donnée, meurt en général la presque totalité des animaux inoculés.

Le poids a diminué considérablement, souvent de moitié. Quelques rares animaux subsistent et succombent quelques mois plus tard, leur organisme a surmonté l'effet toxique, mais au prix d'une transformation importante de la structure normale de leurs parenchymes ; la fibrose et l'infiltration blanche disséminée étouffent encore quelques éléments nodulaires atypiques. La mort survient ici quelques mois plus tard, surtout par *modification*

tissulaire ; en général le poids est bon jusqu'au dernier moment, et chez quelques animaux il augmente.

II. — INOCULATION PAR VOIE ORALE.

Nous administrons à 4 hamsters 10 mg de BCG par voie orale. Un an après ils sont sacrifiés et nous ne trouvons rien d'anormal à l'autopsie. Dans le foie, le long des espaces de Kiernan, très discrète réaction lymphocytaire.

III. — INOCULATION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

Nous inoculons 5 hamsters avec 10 mg, 5 autres avec 1 mg et 3 autres avec 50 mg. Deux d'entre eux (inoculés respectivement avec 50 mg et 10 mg) sont morts précocement, quinze à vingt jours après l'inoculation.

A l'autopsie nous avons trouvé un petit abcès fusiforme, d'aspect crétaqué, bien délimité, qui ne s'est pas fistulisé, et un ganglion sans modifications qui renferme quelques bacilles acido-alcool-résistants ; l'essaimage dans les autres organes est presque nul. Nous avons sacrifié précocement, au bout d'un mois, l'un des animaux ayant reçu 10 mg et nous avons vu que l'abcès n'existait plus. Les 3 autres animaux de la série des 10 mg meurent au septième et au huitième mois, sans rien d'anormal, présentant seulement une rate un peu hypertrophiée. Au bout d'un an nous sacrifions ceux qui ont reçu 1 mg et, de même, nous ne trouvons pas de lésions, la rate est seulement un peu tuméfiée. Ceux qui reçoivent 50 mg succombent un an et deux mois, un an et un mois et demi, un an et vingt jours après l'inoculation, sans rien de particulier à l'autopsie, excepté une grosse rate.

Les images histologiques que nous rencontrons dans les différents organes sont exactement les mêmes que celles produites par le BCG vivant ou mort inoculé par voie intrapéritonéale, nous n'y reviendrons pas. Un fait important cependant est caractéristique de cette voie d'inoculation : l'abcès qui se produit disparaît vite, mais au point d'inoculation les bacilles persistent longtemps en grande quantité ; nous les avons trouvés dans les frottis obtenus avec le tissu fibreux et grasseux intercalé entre les faisceaux musculaires de la patte sept mois et huit mois après l'injection (fig. 10).

DISCUSSION. — On observe les mêmes résultats qu'en employant la voie intrapéritonéale. La dispersion ici est très lente ; la destruction et la réabsorption des corps bacillaires se produit dans les mêmes organes et la mort survient par les mêmes causes.

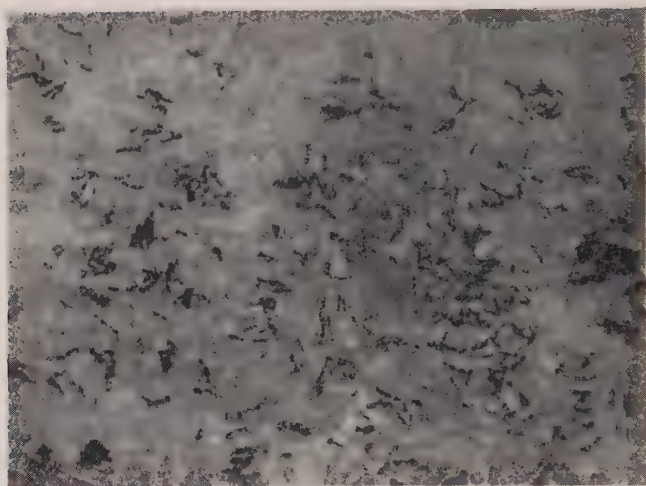


FIG. 10. -- Frottis de l'abcès local correspondant au point d'inoculation chez un hamster inoculé sept mois auparavant avec 10 mg de BCG vivant par voie sous cutanée. Abondants bacilles acido-alcool-résistants.



FIG. 11. — A gauche : poumon de hamster inoculé avec 1 mg de bacilles tuberculeux virulents, à la patte droite ; nombreuses granulations grises disséminées dans les deux organes ; ganglions trachéo-bronchiques caséux. A droite : poumon de hamster inoculé avec 50 mg de BCG à la patte droite ; rien de spécifique ; poumons normaux.

Le BCG inoculé forme un foyer localisé sans atteinte ganglionnaire satellite, pas de points caséux ni de fistule à la peau, les bacilles se disséminent dans les organes du système réticulo-endothélial du hamster en y déterminant les mêmes lésions de réaction cellulaire atypique.

Afin de mieux confronter les résultats obtenus nous avons inoculé 3 hamsters avec 1 mg de bacille tuberculeux virulent de type humain par voie sous-cutanée que nous avons isolé d'un chien mort de bacillose. Les hamsters meurent tous dans les quarante-huit et cinquante jours après l'inoculation virulente et présentent un abcès froid au point d'inoculation. Le ganglion satellite caséux et le ganglion lombaire droit sont altérés, comme les ganglions trachéo-bronchiques. Lésions nombreuses macroscopiques spécifiques sous forme de granulations dans les poumons et de nodules caséux dans le foie et la rate; les images histologiques (fig. 11) sont typiques et spécifiques d'une tuberculose évolutive.

CONCLUSION.

Le bacille tuberculeux chez le hamster provoque une maladie progressive, avec concordance entre les lésions macro- et microscopiques, et un aspect histologique typique et spécifique. La mort est due au *pouvoir pathogène du bacille virulent inoculé*.

Le BCG inoculé au hamster entraîne une réaction générale de tout le système réticulo-endothélial; pas de lésions macroscopiques, uniquement une réaction cellulaire atypique témoin des bonnes propriétés antigéniques du vaccin atténué.

La mort est due à une *intoxication* de l'animal par les produits de désintégration ou de métabolisme des corps bacillaires, secondairement par modification de la structure normale des organes.

Le BCG ne produit *jamais* par conséquent de tuberculose généralisée chez le hamster.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] in A. B. DROOGLEEVER FORTUYN. *Chin. Med. J.*, 1927, **41**, 859, 864 et 1928, **42**, 524.
- [2] T. TUNG et C. SAM WONG. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1940, **43**, 70.
- [3] J. KORNS et Y. C. LU. *Proceed Soc. exp. Biol. Med.*, 1927, **24**, 307.
- [4] J. KORNS et Y. C. LU. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1928, **17**, 279.
- [5] J. KORNS et Y. C. LU. *Chin. Med. J.*, 1927, **41**, 234.
- [6] F. L. PICKOF. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1939, **9**, 339.
- [7] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 445.
- [8] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Presse Méd.*, 1951, **59**, 7.
- [9] J.-L. NICOD, P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Presse Méd.*, 1951, **59**, 605.
- [10] P. HAUDUROY. *Rev. Belg. Path. Med. exp.*, 1951, **21**, 1.

- [11] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 12.
- [12] P. HAUDUROY. *Rev. Med. Suisse Romande*, 1952, **72**, 569.
- [13] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Presse Méd.*, 1952, **60**, 45.
- [14] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **24**, 234.
- [15] A. IMAMURA et Y. KAWAMORI. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG Res., Inst. Tub. Lepr. Tohoku Univers.*, juin 1952.
- [16] T. MUROHASHI et K. YAGANISAWA. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG Res., Inst. Tub. Lepr. Tohoku Univers.*, juin 1952.
- [17] J. OKA. *Rep. Meeting Subcommittee on BCG Res., Inst. Tub. Lepr. Tohoku Univers.*, juin 1952.
- [18] K. BERGER et F. PUNTIGAM. *Zeitschr. Hyg.*, 1953, **137**, 1.
- [19] F. VAN DENSE et F. SÉNÉCHAL. *Ces Annales*, 1954, **87**, 117.

DÉVELOPPEMENT DU VIRUS GRIPPAL ET pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE DE L'ŒUF EMBRYONNÉ

IV. — ACTION INHIBITRICE DE SUBSTANCES ACIDES

par B. FAUCONNIER (*)

(Institut Pasteur, Centre National de la Grippe.
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE)

Il est maintenant nettement établi que le virus grippal a besoin d'un milieu embryonnaire allantoïque légèrement alcalin pour se développer activement [1]. Un abaissement physiologique [2, 3] ou artificiel [4] du pH du liquide allantoïque peut amener un retard et même un arrêt du développement du virus. Nous étudierons ici l'action d'une douzaine de substances acides sur le pH du liquide allantoïque *in vivo*, et parallèlement nous examinerons leur action inhibitrice sur la multiplication du virus dans la cavité allantoïque.

Les premiers acides utilisés ont été des acides minéraux (acides chlorhydrique, borique, phosphorique). Ils se sont montrés décevants tant du point de vue de leur action acidifiante dans l'œuf que du fait de leur toxicité pour l'embryon. Nous n'en parlerons pas plus. Ce sont les résultats obtenus avec des acides organiques (monoacides, diacides et polyacides) parmi les plus courants et les plus aisés à se procurer qui feront l'objet de cette note. En même temps que ces acides, le chlorure d'ammonium, connu en pharmacologie pour ses propriétés acidifiantes, a été étudié comparativement.

MATÉRIEL UTILISÉ. — Œufs embryonnés : œufs de poule de race Leghorn, d'un poids moyen de 55 g, incubés à la température de 38°5 C.

Souche de virus grippal : une souche A-PR8 entretenue sur œuf par passages allantoïques. Titre infectant sur œuf : $10^{-8,5}$.

Substances chimiques étudiées :

Monoacide organique : acide lactique : $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO}_2\text{H}$ - (AL).

Diacides organiques : acide oxalique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CO}_2\text{H}$ - (OX) ; acide malonique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H}$ - (MA) ; acide succinique : $\text{CO}_2\text{H} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO}_2\text{H}$ - (AS) ; acide adipique : $\text{CO}_2\text{H} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CO}_2\text{H}$ -

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 avril 1955.

(ADP) ; acide pimélique : $\text{CO}_2\text{H} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO}_2\text{H}$ - (PI) ; acide maléique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$ - cis. (MALE) ; acide fumarique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$ - trans. (FU) ; acide tartrique : $\text{CO}_2\text{H} - (\text{CHOH})_2 - \text{CO}_2\text{H}$ - (AT).

Triacides organiques : acide citrique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH})(\text{CO}_2\text{H}) - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H}$ - (AC) ; acide aconitique : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{CO}_2\text{H}) = \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$ - (ACO) ; acide tricarballicque : $\text{CO}_2\text{H} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CO}_2\text{H}) - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H}$ - (TRI).

Sel d'acide minéral : chlorure d'ammonium : ClNH_4 - (CLA).

Globules de poulet : ils sont prélevés avec du citrate de sodium à 1 p. 100, lavés trois fois et mis en suspension à 0,5 p. 100 en eau physiologique (ClNa 8,5 p. 1 000).

CONDITIONS GÉNÉRALES D'EXPÉRIENCE ET MÉTHODE EMPLOYÉE. — Le liquide allantoïque d'un œuf embryonné de 10-11 jours est à un pH nettement alcalin et voisin de pH 8. Notre intention de faire baisser ce pH par l'introduction d'une substance acide (acide pur ou sel acide) sans provoquer la mort de l'embryon s'est heurtée dès le début de nos expériences à des difficultés d'ordre différent.

Pour comparer les effets acidifiants, toxiques et inhibiteurs de la multiplication virale de diverses substances, il convient de partir sur des données très strictes.

1° Les œufs embryonnés doivent avoir rigoureusement le même âge (11 jours pour le cas présent), sinon la différence dans les quantités de liquides allantoïques produit des écarts dans les concentrations finales de substance injectée dans l'œuf. D'autre part, la résistance d'un embryon de 10 jours est beaucoup plus faible que celle d'un embryon de 12 jours.

2° Pour les mêmes raisons, la température d'incubation des œufs avant injection du produit doit être bien définie et ne doit pas varier, un œuf se développant plus rapidement à 39° qu'à 37°.

3° La température après injection du produit doit être également toujours identique, car la toxicité d'une substance est beaucoup plus faible et son action acidifiante moins prononcée dans des œufs mis à 39° que dans ceux mis à 37°. Ceci se conçoit, car un œuf en plus grande activité métabolique transformera plus rapidement les substances étrangères injectées.

4° Enfin les œufs doivent avoir un calibre voisin, et les lots employés pour l'étude de chaque produit doivent comprendre un nombre d'œufs suffisant (au moins 20).

Dans ces conditions, et pour les expériences décrites ci-après, la définition de la dose toxique 50 p. 100 d'un produit est la suivante : c'est celle qui tue 50 p. 100 des embryons en moins de vingt-six heures.

I. — ACTION DE SUBSTANCES ACIDES SUR LE pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE *in vivo*.

Avant d'examiner l'action inhibitrice de chacune des substances il est intéressant d'étudier leur action sur le pH du liquide allantoïque d'œufs embryonnés normaux non infectés et poursuivant leur incubation à 38°5. On pourra voir ainsi dans quelle mesure

il est possible de rattacher cette action à celle exercée sur la multiplication du virus dans les mêmes conditions.

EXPÉRIMENTATION. — Des lots d'une vingtaine d'œufs embryonnés de 11 jours reçoivent par voie allantoïque et par œuf 1 ml d'une solution à 2,5 p. 100 (soit 25 mg par œuf) d'un des huit acides suivants : acide lactique (AL), tartrique (AT) succinique (AS), adipique (ADP), pimélique (PI), citrique (AC), aconitique (ACO), tricarballoylique (TRI), et de chlorure d'ammonium (CLA). Une série d'œufs (lot témoin) reçoit dans les mêmes conditions 1 ml d'eau physiologique.

Après une légère agitation de l'œuf, on ponctionne stérilement 0,2 ml de liquide allantoïque de chaque œuf, et l'on réunit les prélèvements en dix pools distincts. On obtient ainsi dix fois 4 ml d'extraits de liquides allantoïques correspondant aux neuf substances étudiées et au témoin. Le pH de chaque pool est déterminé au moyen d'un électro-pH-mètre (Heito), et correspond au temps zéro. Les œufs sont ensuite tous remis le plus rapidement possible à 38°5 C, et périodiquement, à une heure, quatre heures trente, sept heures et vingt-six heures après injection, les ponctions des différents lots sont pratiquées et les pH déterminés d'une manière identique.

RÉSULTATS. — En portant en abscisse le temps et en ordonnée les pH, on obtient les courbes de la figure 1. On voit ainsi que les différentes substances n'ont pas toutes la même action acidifiante. Les unes (AL, AT, PI), si elles abaissent vigoureusement le pH dès l'injection (pH inférieur à 5,5), ne maintiennent pas longtemps ce pH aux valeurs initiales. Les courbes de remontée du pH sont accentuées et rapides. A vingt-six heures, le pH est aux alentours de 7. Ces acides ont été rapidement neutralisés et transformés. Par contre, les autres acides ont continué à faire descendre le pH du liquide jusque vers la deuxième heure. Les pH amorcent ensuite une remontée variable suivant les substances, qui les amènent à vingt-six heures entre pH 6 et 7. Enfin le chlorure d'ammonium a une place bien à part. Son action sur le pH est lente, mais finit par être, au bout de vingt-six heures, plus prononcée que celle de la plupart des acides. Nous reviendrons sur ces constatations dans la discussion finale.

II. — ACTION DES SUBSTANCES ACIDES SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS.

EXPÉRIMENTATION. — Des lots d'une vingtaine d'œufs embryonnés de 11 jours sont inoculés par voie allantoïque avec une souche de virus A-PR8 diluée à 10^{-6} . Une heure après inoculation du virus, un des lots reçoit par la même voie 1 ml d'eau physio-

logique par œuf (lot témoin), tandis que les autres lots reçoivent dans les mêmes conditions 1 ml d'une solution d'une des substances chimiques envisagées. Tous les lots sont alors placés à l'étuve à 38°5 C pendant vingt-six heures, puis à 4° C pendant quinze heures. Les liquides allantoïques sont ensuite prélevés en pools séparés correspondant à chaque substance étudiée.

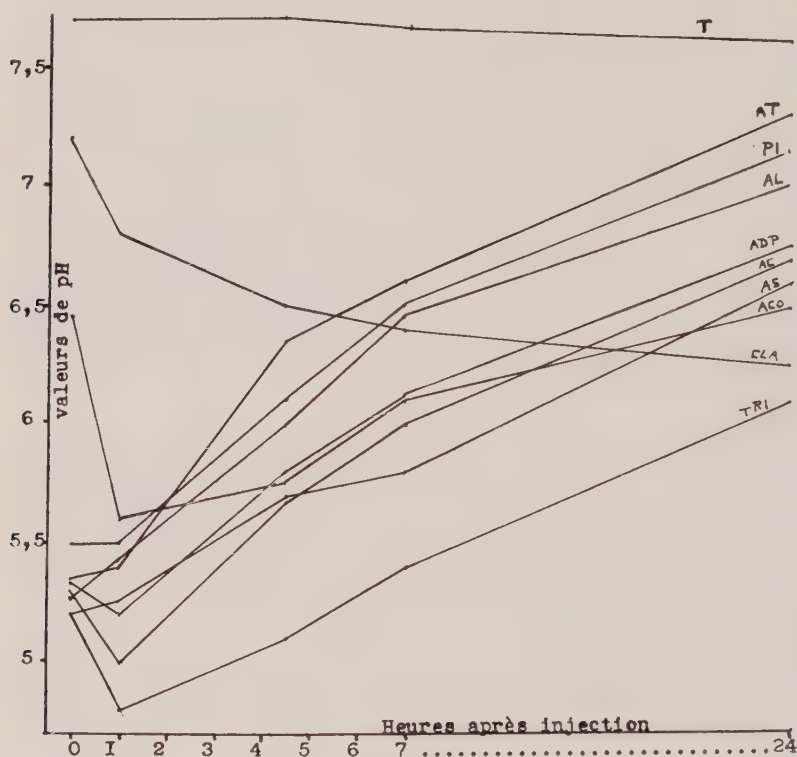


FIG. 1.

La quantité de virus produit dans chaque lot est donnée par le nombre d'unités hémagglutinantes moyennes par œuf suivant la formule [5] $U = \frac{V.HA}{N}$ ou V est le volume total de liquide allantoïque d'un lot, HA le titre hémagglutinant, et N le nombre d'œufs utilisés dans un lot. En ramenant à 100 le nombre des unités hémagglutinantes moyennes du lot témoin, il est possible de déterminer le pourcentage de virus produit dans les lots traités par

rapport au lot témoin, et par suite l'inhibition due à la substance étudiée.

TABLEAU I.

	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg
AS	32	15	10,5	1	<0,1
AC	53	43	15	6	-
AT	100	35	30	8	-
ADP	92	54	36	25	-
ACO	50	22,5	14	3	-
TRI	74	19	12	2	-
PI	100	95	80	43	23
AL	100	100	100	77	51
CLA	58	32	16	7	<0,05

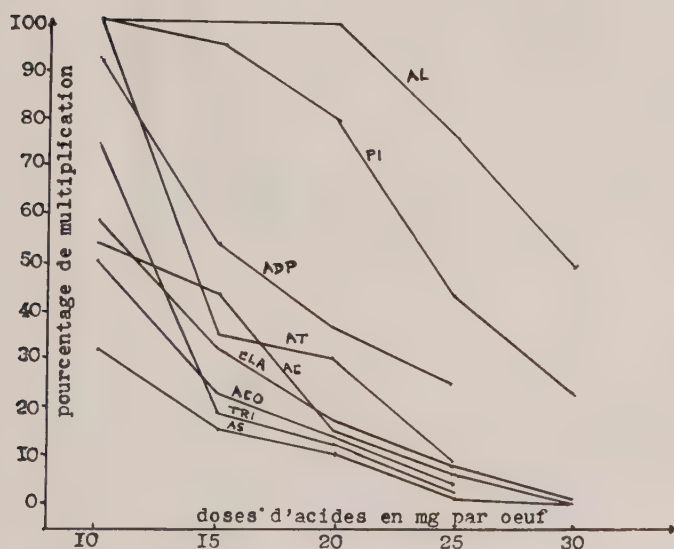


FIG. 2.

RÉSULTATS. — Le tableau I et la figure 2 donnent le pourcentage de virus produit après vingt-six heures de culture à 38°5 pour des

doses d'acide de 10, 15, 20, 25 et 30 mg par œuf. L'absence de chiffre pour une certaine quantité de l'une des substances signifie que l'on a dépassé la dose toxique 50 p. 100. Le tableau II donne

TABLEAU II. — Doses toxiques 50 p. 100 en milligrammes par œuf.

ACIDES	AS	ACO	CLA	PI	TRI	AT	ADP	AC	AL	MA	MAME
Doses toxiques 50 p. 100 en mg	30	25	30	25	25	25	25	25	30	15	15

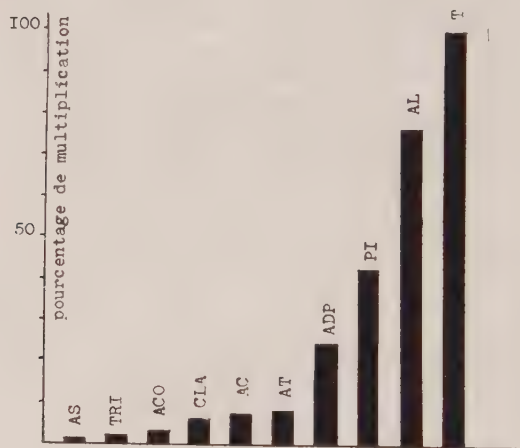


FIG. 3.

d'ailleurs cette dose toxique 50 p. 100 pour chaque acide étudié. La figure 3 résume les activités comparées des neuf substances injectées à la dose de 25 mg (dose toxique 50 p. 100 pour la plupart d'entre elles).

On constate ainsi que tous les acides ont une action inhibitrice sur le développement du virus, mais à des degrés divers.

DISCUSSION GÉNÉRALE.

Bien que le nombre des substances étudiées soit assez restreint, il est cependant intéressant de faire un certain nombre de remarques sur les résultats obtenus tant du point de vue de l'action

de ces substances sur le pH du liquide allantoïque que sur leur activité sur la multiplication du virus.

1° ACTION ACIDIFIANTE ET ACTION INHIBITRICE. — L'examen des figures 1, 2 et 3 montre que ces deux actions sont sensiblement parallèles, aux erreurs d'expérience près, pour la majorité des substances étudiées. Celles qui sont capables de maintenir en vingt-six heures dans le liquide allantoïque un pH peu élevé (TRI, AS, ACO), sont également douées des meilleures actions inhibitrices de la multiplication. De même AL et PI, qui sont peu actifs sur le pH, ont peu d'action comparativement sur le développement du virus. Nous pouvons expliquer ce phénomène en émettant l'hypothèse, très vraisemblable étant données les études pratiquées antérieurement, que le virus ne peut se développer tant que le pH est trop bas. Dès que celui-ci remonte à une valeur suffisante du fait de la neutralisation de l'acide injecté, la multiplication se produit. Mais le retard apporté est fonction du retard de la neutralisation de l'acide par l'embryon. On peut donc dire en résumé que la substance la plus active sur la multiplication sera celle qui maintiendra le plus longtemps le pH du liquide allantoïque à une valeur suffisamment basse (inférieure à 5,8).

Certaines substances semblent faire exception. Les acides tartrique (AT), succinique (AS) et malonique (MA) paraissent plus inhibiteurs qu'acidifiants. Ces substances, du moins en ce qui concerne les deux dernières, possèdent une action inhibitrice autre que celle concernant le pH, ainsi que l'a montré Hannoun [6].

Le cas du chlorure d'ammonium est particulier. Si son action inhibitrice n'est pas plus prononcée malgré l'activité de son pouvoir acidifiant au bout de vingt-six heures, c'est que dans les premières heures son activité sur le pH est peu importante. L'avance prise par la multiplication du virus dans les œufs traités avec CLA par rapport aux œufs traités avec les acides ne peut être tout à fait comblée en vingt-six heures. Mais il le serait probablement pour une période plus prolongée, trente ou trente-six heures par exemple. L'expérience suivante donne plus de clarté au phénomène. Dans les mêmes conditions générales que l'expérimentation déjà pratiquée plus haut, des lots d'œufs reçoivent les diverses substances mais d'une manière différente : 15 mg à 1 heure et 15 mg à 18 heures. La figure 4 montre que la multiplication n'a pas été brusquement stoppée à 18 heures avec CLA, comme elle l'a été par l'abaissement brutal du pH avec les acides.

2° ACTIVITÉ, FORMULE, DISSOCIATION ET TOXICITÉ. — Bien que leur nombre soit assez restreint, l'examen de la formule chimique des acides doués de propriétés acidifiantes prononcées et durables

peut être de quelque intérêt pour s'orienter vers l'étude d'un groupe d'acides particuliers. Les triacides (ACO, TRI et AC) semblent en général plus actifs que les diacides (AS, ADP, PI et AT). Le monoacide étudié (AL) est peu satisfaisant.

Dans la série de l'acide succinique, celui-ci est nettement plus actif que l'acide adipique, lui-même plus intéressant que l'acide pimélique. Les acides ayant une ou deux fonctions alcool (AT, AL, AC) semblent plus toxiques et moins actifs.

Enfin, en considérant les trois triacides étudiés qui présentent une formule très voisine, on voit qu'une simple déshydrogénation

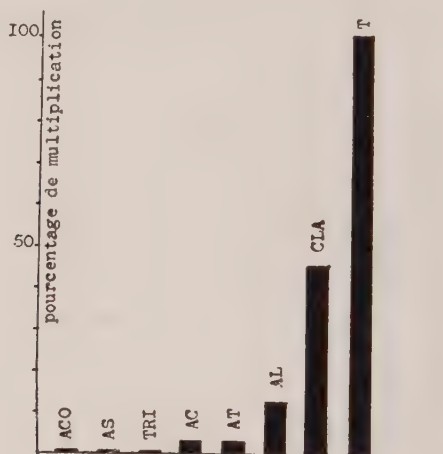


FIG. 4.

(TRI \rightarrow ACO), ou bien le remplacement d'un H par un OH (TRI \rightarrow AC) rend l'acide tricarballoylique moins actif.

Comme le montre le tableau III, l'acidité des solutions

TABLEAU III. — pH des solutions d'acides à 2,5 p. 100.

	AS	ACO	CLA	PI	TRI	AT	ADP	AC	AL
pH	2,4	1,9	5	2,1	2,3	2,05	2,6	2,05	2,2

injectées ne paraît pas jouer un rôle spécial. Les solutions à 2,5 p. 100 de PI et de AL ont un pH inférieur aux solutions identiques de AS et de TRI.

La dose toxique 50 p. 100 telle qu'elle a été définie antérieurement est de 25 mg par œuf pour la majorité des substances étudiées. Les acides maléique, fumarique, malonique et oxalique qui possèdent une toxicité élevée pour l'œuf n'ont pas été étudiés complètement. Nous nous sommes borné à constater que leurs pouvoirs acidifiant et inhibiteur n'était pas plus prononcés que ceux des autres substances moins toxiques.

Parmi celles-ci, l'acide succinique est l'acide le plus intéressant, car il allie une bonne action acidifiante à une toxicité faible. A la dose de 30 mg par œuf (dose toxique 50 p. 100), il est plus actif que les acides tricarballoylique et aconitique à leur dose maxima de 25 mg. Il a d'ailleurs été montré autre part dans quelle mesure des doses espacées de cet acide pouvaient s'opposer efficacement à la multiplication du virus dans la cavité allantoïque [4].

En conclusion, la complexité de ce milieu biologique qu'est le liquide allantoïque, complexité causée par sa composition et son pouvoir tampon variable suivant l'âge de l'embryon d'une part [7], et par son rôle dans la vie de l'embryon d'autre part, qui en fait à 11 jours non pas seulement un milieu d'excrétion, mais encore un milieu de nutrition [8, 9, 10, 11] capable d'échanges ioniques multiples, permet difficilement de faire des déductions pour l'emploi de telle ou telle substance présumée acidifiante. Cependant, la comparaison entre l'activité du chlorure d'ammonium et celle des autres substances, nous amène à supposer que les sels d'ammonium d'acides plus actifs sur l'abaissement du pH allantoïque que ne l'est l'acide chlorhydrique, seront à la fois plus efficaces contre la multiplication du virus et moins toxiques pour l'embryon. En fait, la substance inhibitrice idéale serait celle qui abaisserait rapidement et d'une façon durable le pH allantoïque à un pH inférieur à 5,8-6,00 puisque, comme nous l'avons montré ailleurs [3], cette valeur représente environ le minimum compatible avec la multiplication du virus.

RÉSUMÉ.

L'étude menée comparativement avec une douzaine d'acides organiques et le chlorure d'ammonium, tant du point de vue de leur action sur le pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné qu'en ce qui concerne leur activité sur la multiplication du virus grippal dans ce même liquide, montre que ces deux actions sont liées. La substance qui produit un abaissement plus prononcé et surtout plus durable du pH du liquide, est également capable d'amener un retard plus important dans les phénomènes de multiplication du virus. Parmi les acides étudiés, les triacides aconitique et tricarballoylique, ainsi que le diacide succinique, ont donné les meilleurs résultats. Le chlorure d'ammonium, par son

activité acidifiante moins rapide mais plus durable, possède une bonne action inhibitrice.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1955, **88**, 96.
- [2] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1954, **86**, 710.
- [3] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 222.
- [4] B. FAUCONNIER. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1886.
- [5] C. HANNOUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 864.
- [6] C. HANNOUN. *Thèse doct. ès sciences*, Paris, 1954.
- [7] C. A. RANGLES jr. et A. L. ROMANOFF. *Arch. Biochem.*, 1954, **49**, 160.
- [8] T. ISEKI. *Z. physiol. Chem.*, 1930, **188**, 189.
- [9] J. SULA. *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 911.
- [10] H. B. FELL et R. ROBINSON. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2243.
- [11] P. A. WALKER. *J. gen. Physiol.*, 1943, **26**, 503.
- [12] J. NEEDHAM. *Chemical Embryology*, 1931, 3 vol., Cambridge University press.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 5 Mai 1955.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.

COMMUNICATIONS

OBSERVATIONS COMPARÉES SUR LA PRODUCTION IN VIVO ET IN VITRO DE FORMES L DE *PROTEUS VULGARIS* ET *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SOUS L'INFLUENCE D'ANTICORPS SPÉCIFIQUES

par E. GRASSET (*).

(*Institut d'Hygiène et Institut de Physique de l'Université de Genève.*)

Dans une communication antérieure [1] nous avons décrit les modalités de transformation en formes L, chez la souris, de *Proteus vulgaris* ainsi que de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Escherichia coli* sous l'influence de pénicilline injectée par voie sous-cutanée à ces animaux.

Nous nous proposons dans cet exposé de présenter les observations concernant les transformations en formes L de *P. vulgaris* et *K. pneumoniae* injectés dans la cavité péritonéale de souris soumises à l'administration sous-cutanée de sérum spécifique anti-*Proteus* ou anti-*K. pneumoniae*.

Les observations récemment publiées par Carrère et Roux [2] sur la mise en évidence de formes L de *P. vulgaris* et *Salmonella typhi* en cultures de bouillon, additionnées de sérum spécifique de lapin, de même que dans les hémocultures obtenues de ces animaux après injection intraveineuse de ces germes, nous incitent par ailleurs à exposer nos observations sur les modalités comparées de production de formes L de diverses *Enterobacteriaceae*, *in vitro* au contact de sérum spéci-

(*) Travail exécuté grâce à une subvention de la Fondation Fritz Hoffmann-La Roche, à Bâle, pour l'expansion en Suisse du travail scientifique exécuté par équipes.

fique, et par ailleurs *in vivo* dans la cavité péritonéale de souris injectées avec ces microorganismes et soumises à l'injection à distance des anticorps respectifs (1).

I. EXPÉRIENCES *in vitro* AVEC *Proteus vulgaris*, SOUCHES HX19 ET OX19 (FELIX). — Nous avons utilisé comme anticorps spécifiques les sérums de lapins immunisés par injections de suspensions bacillaires des souches correspondantes.

Ces sérums agglutinaient les suspensions bactériennes homologues, vivantes ou formolées, aux dilutions de 1 : 10 000 et 1 : 12 000 après un contact de trois à quatre heures à 37° C.

Nous avons recherché par ailleurs le pouvoir agglutinant de ces mêmes sérums à l'égard de suspensions de corps globuleux obtenus à partir des souches *Proteus* HX19 et OX19 en bouillon tryptone Difco aéré additionné de pénicilline, à raison de 300 U par centimètre cube. Ces sérums anti-*Proteus* OX19 et HX19 ont de même agglutiné ces suspensions de corps globuleux formolés à un titre légèrement inférieur à celui des suspensions bacillaires correspondantes.

L'addition de sérum spécifique anti-OX19 et anti-HX19 aux cultures en bouillon tryptone Difco aéré de quatre heures à 37° C des souches OX19 et HX19 a pour résultat la transformation au cours des heures suivantes en des formes L, se traduisant tout d'abord par un allongement et empatement des éléments microbiens, puis des formes filamenteuses et formation de corps globuleux. Malgré l'agitation résultant de l'aération des milieux, la majorité des éléments se présente, à l'examen microscopique, agglutinés en petits amas. On assiste dans les heures suivantes à un éclaircissement de la culture se traduisant au microscope à contraste de phase par des phénomènes de lyse des corps globuleux et des formes filamenteuses sous l'influence du sérum spécifique. La conservation de ces sérums spécifiques pendant plusieurs mois à 4° C retarde et inhibe dans les mêmes conditions la transformation de ces germes en formes L. L'addition de complément de cobaye aux sérums ainsi conservés favorise à nouveau la production de formes L, comme observé par Dienes et coll. [3] pour *S. typhosa*.

EXPÉRIENCES *in vivo*. — A des souris blanches nous avons injecté dans la cavité péritonéale 0,5 cm³ de suspensions contenant 10⁹ bactéries/cm³ de cultures en bouillon tryptone Difco aéré de *Proteus* OX19 et HX19 respectivement. Dans les minutes suivantes ces animaux étaient soumis à une injection sous-cutanée de 0,1 à 0,2 cm³ du sérum anti-*Proteus* correspondant, quantités qui s'étaient montrées suffisantes pour inhiber la prolifération bactérienne dans la cavité péritonéale sans exercer une action antibactérienne par trop massive et rapide.

Deux heures plus tard leur liquide péritonéal examiné au microscope à contraste de phase, montrait, en dehors de formes bacillaires en minorité, des éléments en voie de transformation en formes L, bacilles allongés ou formes filamenteuses plus ou moins épaissies,

(1) Observations que nous avons eu l'occasion d'exposer au Dr Klieneberger-Nobel, lors d'un colloque sur les formes L, à l'occasion de sa visite, à Genève, en septembre 1954.

certaines présentant des renflements sphériques sur le corps bacillaire. Des examens effectués durant l'heure suivante montraient des stades plus avancés de transformation : corps globuleux plus ou moins volumineux sur l'axe des filaments. Certains corps globuleux libérés se trouvaient à l'état isolé dans le liquide péritonéal ; on observe de même des agglutinats constitués d'éléments bacillaires, de formes filamenteuses et de corps globuleux. On remarque aussi dans l'exsudat péritonéal des globules blancs ayant phagocyté un nombre considérable de bactéries ainsi que des corps globuleux de différentes tailles.

Dans des examens plus tardifs on assiste à une lyse portant sur la majorité des éléments microbiens aux divers stades d'évolution des formes L. Lors de concentrations élevées de sérums, les transformations successives d'allongement, formation de corps globuleux, de même que leur lyse évoluent très rapidement, comme il est observé dans le cas de formation de formes L *in vitro* et *in vivo*, sous l'influence de la pénicilline.

Des expériences témoins faites avec les mêmes cultures en l'absence de sérum spécifique n'ont pas permis de constater des modifications spontanées en formes L de ces microorganismes tant *in vivo* qu' *in vitro*.

Ces expériences ont été complétées par une série de tests *in vitro* et *in vivo* avec un sérum anti-*Proteus* OX19 purifié préparé chez le cheval selon A. Felix aux Laboratoires Wellcome de Recherches physiologiques à Londres, en 1944, et soumis à une purification enzymatique par la méthode de Pope. Ces globulines conservées à 4° C au cours de ces dix dernières années et mises au contact de suspensions bactériennes formolées OX19, ont agglutiné ces dernières aux dilutions de 1 : 10 000 à 1 : 20 000 avec une zone d'inhibition et d'agglutination retardée pour les concentrations les plus élevées de sérum de 1 : 100 à 1 : 5 000.

Il est intéressant de remarquer que l'addition de ces mêmes concentrations élevées de ce sérum à des cultures de six heures en bouillon tryptone Difco aéré de *Proteus* OX19 donnent lieu à une agglutination rapide, tant *in vitro* qu'*in vivo*. L'addition de ces globulines aux cultures avait pour résultat un allongement des corps bacillaires en des formes filamenteuses, certaines avec formation d'éléments sphériques réfringents. Ces transformations étaient suivies de phénomènes de lyse intéressant également les agglutinats et qui se manifestaient macroscopiquement par un éclaircissement des cultures. L'introduction de complément dans ces mélanges accélère l'évolution de ces transformations.

II. *Klebsiella pneumoniae*. FORMATION DE FORMES L *in vivo* ET *in vitro* SOUS L'INFLUENCE DU SÉRUM SPÉCIFIQUE. — Une expérimentation similaire a été réalisée avec des souches de *K. pneumoniae* souche A/500 et sérum spécifique obtenu par immunisation des lapins contre ces dernières.

In vitro, le sérum anti-*K. pneumoniae* A/500 agglutinait à un titre de 1 : 600 à 37° C la suspension bactérienne vivante ou tuée de cette souche.

L'addition de 0,1 à 0,2 cm³ de ce sérum à 10 cm³ d'une culture de quatre heures de bouillon tryptone Difco aéré a abouti dans les trois heures suivantes à la transformation en formes L, formes allongées, boudinées, filamenteuses, donnant naissance à des renflements globulaires, et formation de corps globuleux se libérant pour passer à l'état libre dans le milieu. Ces corps globuleux se formaient rapidement et présentaient à une phase ultérieure des phénomènes de lyse très semblables à ceux observés avec la pénicilline.

In vivo, des souris soumises à l'injection intrapéritonéale de 0,5 cm³ d'une culture de *K. pneumoniae* de quatre heures en bouillon tryptone Difco aéré recevaient, par ailleurs, 0,2 cm³ de sérum spécifique anti-*K. pneumoniae* A/500 par voie sous-cutanée. Les examens à courts intervalles du liquide péritonéal des animaux sacrifiés entre la première et la troisième heure suivante montraient un allongement de la majorité des éléments bactériens donnant lieu à des formes filamenteuses plus ou moins longues et apparition de renflements se transformant en corps globuleux. Ces derniers passaient à l'état libre dans l'exsudat péritonéal en nombre rapidement croissant, comme le prouvaient les examens effectués toutes les quinze minutes durant les heures suivantes.

L'emploi de doses critiques de sérum spécifique permet un rythme ralenti de l'évolution de ces processus au cours d'une période de seize à vingt-quatre heures avec transformation des éléments bacillaires en des formes filamenteuses très allongées et boudinées et formation tardive de corps globuleux sur certaines d'elles uniquement. Dans de telles conditions, il est possible d'observer la persistance d'un petit nombre d'éléments bacillaires qui paraissent échapper à l'action du sérum spécifique et qui, après vingt-quatre heures, commencent à proliférer en petits groupes d'éléments bacillaires typiques montrant la formation d'une capsule bien visible au microscope à contraste de phase.

CONCLUSIONS. — L'addition à des cultures en bouillon tryptone Difco aéré de *P. vulgaris* souches HX19 et OX19, de sérum spécifique de lapins immunisés contre ces microorganismes, aboutit au cours des heures suivantes à la transformation en formes L de ces bacilles. Ces transformations sont accompagnées de phénomènes d'agglutination de ces éléments ainsi que de formes bacillaires dont la persistance augmente avec les dilutions croissantes de sérum.

Pour les mélanges contenant des concentrations élevées de sérum spécifique, on observe au cours des heures suivantes des phénomènes de lyse de ces agglutinats de formes L, qui se traduisent macroscopiquement par un éclaircissement des cultures ainsi traitées.

La conservation pendant plusieurs mois à 4° C de ces sérums spécifiques n'affecte pas sensiblement leur pouvoir agglutinant, mais inhibe partiellement ou totalement la transformation *in vitro* en formes L comme exposé ci-dessus. L'introduction de complément dans ces mélanges active à nouveau la production de formes L et la lyse de ces dernières. Des constatations semblables ont été faites avec la globuline γ anti-OX19 préparée par A. Felix en 1944.

L'injection dans la cavité péritonéale de souris de suspensions

bacillaires vivantes de *Proteus* OX19 et HX19 cultivées en milieu Difco tryptoné aéré, suivie de l'administration de sérum spécifique par voie sous-cutanée, aboutit au cours des heures suivantes à la transformation, dans le liquide péritonéale de ces animaux, des éléments bacillaires en formes L : éléments allongés, filamenteux, donnant naissance à des corps globuleux qui sont libérés dans la cavité péritonéale et sont susceptibles de subir des phénomènes de lyse plus ou moins rapides.

La formation de formes L dans des conditions analogues a été observée pour *K. pneumoniae*, tant en mélange *in vitro* des cultures de ce microorganisme avec le sérum spécifique, qu'*in vivo* dans le péritoine de souris soumises à l'injection sous-cutanée du sérum spécifique obtenu chez le lapin immunisé par injections de ce microorganisme.

Nous tenons à remercier M^{lle} T. Bonne et M^{lle} J. Messi pour leur aide technique précieuse dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] E. GRASSET et V. BONIFAS. *Ces Annales*, 1955, **88**, 651.
- [2] L. CARRÈRE et J. ROUX. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 2052.
- [3] L. DIENES, H. J. WEINBERGER et S. MADOFF. *J. Bact.*, 1950, **59**, 755.

RECHERCHES SUR L'ANTAGONISME DIRECT D'*E. COLI* VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE

par E. DE LAVERGNE, J.-C. BURDIN et J. SCHMITT.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Nancy.
[professeur V. DE LAVERGNE].)

Depuis les travaux de Janbon, il est reconnu que dans les entérites post-mycothérapiques à staphylocoques, ce dernier germe est rencontré dans les selles en grande abondance, souvent même à l'état pur. Nous-mêmes avons eu l'occasion d'observer de tels faits.

D'autre part, ayant examiné divers antibiogrammes pratiqués sur des mélanges d'*E. coli* et de staphylocoques (pus, urines, etc.), nous avons souvent constaté la prolifération de ce dernier germe, seulement dans les zones d'inhibition du *coli*. Le staphylocoque formait couronne autour des disques d'antibiotiques et on ne le retrouvait pas dans le reste de boîte, envahi par *E. coli*.

Ces deux ordres de constatations nous ont conduits à rechercher s'il existait un antagonisme d'*E. coli* vis-à-vis du staphylocoque.

Cette question a déjà été étudiée par Faltin [1], Koch [2], Régnier [3], Gundel [4] et Gilliesen [5] ; leurs résultats ne sont pas tous concordants.

Nous avons repris ce problème et effectué nos recherches sur 13 souches d'*E. coli* vis-à-vis de 44 staphylocoques (11 non pathogènes) ; les résultats obtenus furent identiques pour toutes les souches utilisées.

Différentes techniques furent pratiquées, mais celle de l'incorporation nous a donné les résultats les plus nets. En milieux liquides, en effet, et par les procédés des stries croisées et des touches sur gélose en boîtes de Petri, l'antagonisme ne peut être affirmé. Nous en comprendrons ultérieurement les motifs.

Par contre, la méthode d'incorporation a donné des résultats positifs. 3 ml de culture de vingt-quatre heures d'*E. coli* étaient incorporés dans 12 ml de gélose ordinaire, en boîte de Petri. Une goutte de culture de staphylocoque était alors répartie sur la surface de la gélose incorporée. Après vingt-quatre heures d'étuve, aucun développement des staphylocoques ne fut observé. Il n'y avait là que bactériostase, car en raclant la surface de la gélose et en la réensemencant en bouillon ordinaire, la culture se produisait.

Pour apprécier la spécificité du phénomène, nous avons réalisé l'épreuve inverse : incorporation du staphylocoque, et répartition d'*E. coli* en surface. Ce germe s'est développé facilement après vingt-quatre heures d'étuve.

De même d'autres souches, *S. para B*, *S. typhi*, *Sh. sonnei*, *F. alcaligenes*, *Ps. aeruginosa*, ont été réparties sur gélose incorporée par *E. coli*. *Pseudomonas*, *Fecalis alcaligenes* et quelques *S. para B* se sont normalement développés.

Nos souches d'*E. coli* se sont donc montrées antagonistes, par cette méthode, de certaines espèces et plus particulièrement de nos souches de staphylocoques.

Avant d'envisager le mécanisme de cette action, nous avons éliminé quelques facteurs d'erreurs.

Ne s'agissait-il pas en effet, d'un « faux antagonisme » dû à une plus rapide ou plus grande multiplication des colibacilles ? Les courbes de croissance que nous avons tracées (méthode néphélométrique) et les numérations de germes que nous avons pratiquées nous ont permis d'éliminer ces objections.

Ne pouvait-on aussi incriminer le rôle d'une modification du pH du milieu par *E. coli* ? Effectivement, ce germe alcalinise les bouillons ordinaires dans lesquels il se développe. Nous avons constaté qu'après vingt-quatre heures d'étuve, les cultures d'*E. coli* en bouillon présentaient un pH de 8,2 (mesure électrométrique).

Nous avons alors préparé un bouillon à ce pH et nous avons commencé un staphylocoque. Celui-ci s'est multiplié abondamment : le rôle du pH n'intervenait donc pas.

Enfin ne pouvait-on soutenir qu'*E. coli* avait épuisé tous les milieux nutritifs ? Il n'en était rien.

Après vingt-quatre heures d'étuve, nous avons filtré une culture d'*E. coli*. Dans le filtrat stérile, nous avons ensemencé un staphy-

locoque. Celui-ci s'est parfaitement développé. Les matériaux nutritifs n'étaient donc pas épuisés.

En conclusion, il existe bien un véritable antagonisme d'*E. coli* vis-à-vis du staphylocoque.

Par quel mécanisme s'effectue cet antagonisme ? La présence d'une substance soluble n'a pu être démontrée. En effet, l'incorporation du filtrat de culture d'*E. coli* a permis le développement du staphylocoque ensemencé en surface. Celui-ci peut même se développer dans le filtrat pur de *coli*.

L'antagonisme ne semblait donc pas reposer sur la présence d'une substance diffusible. Nous en avons eu d'autres preuves : dans un sac de collodion, nous avons introduit du bouillon ordinaire et nous l'avons ensemencé par du staphylocoque. Le sac fut placé dans un ballon de culture d'*E. coli* : le staphylocoque s'est développé facilement.

Le filtrat de culture d'*E. coli* n'était donc pas antagoniste du staphylocoque. Par contre, une culture d'*E. coli* fut centrifugée, les corps microbiens lavés en eau physiologique, puis incorporés. Cette fois, l'inhibition du staphylocoque s'est produite.

La présence du corps microbien était donc nécessaire à l'antagonisme.

Une culture d'*E. coli* chauffée à 100°, cinq minutes, fut incorporée, le staphylocoque cultive normalement. C'était donc que le germe vivant et non tué était responsable de l'inhibition du staphylocoque. Effectivement, l'incorporation d'*E. coli*, en milieu de Chapman, laisse croître le staphylocoque puisque le colibacille ne peut cultiver sur ce milieu. De même l'incorporation d'*E. coli* par le chloroforme permet le développement du staphylocoque.

Mais l'expérience suivante nous parut la plus décisive. Nous avons incorporé une culture d'*E. coli* en gélose ordinaire et réparti à la surface une goutte de culture de staphylocoque. Puis au centre de la boîte, nous avons déposé une pastille de streptomycine (active sur *E. coli* mais non sur nos souches de staphylocoques). Après vingt-quatre heures d'étuve, nous avons noté une couronne de colonies de ce dernier germe autour de l'antibiotique, et dans la zone seulement d'inhibition d'*E. coli*. Le staphylocoque avait pu se développer dans le seul endroit où *E. coli* était absent, c'est-à-dire autour de la pastille de streptomycine.

Ce fait est particulièrement démonstratif sur les microphotographies prises, et fut vérifié de nombreuses fois. Il représente la meilleure preuve de cet antagonisme d'*E. coli* vis-à-vis du staphylocoque, antagonisme dû, non à la libération d'un principe dans le milieu ambiant (antibiotique ou phage), mais à la présence du corps microbien vivant d'*E. coli*. Il s'agit d'un phénomène d'antagonisme direct décrit par Neufeld [6].

Et ceci explique l'échec des méthodes de mise en évidence de l'antagonisme reposant sur la diffusion d'un agent antibiotique (milieux liquides, stries, épreuves des touches, etc.).

Des faits identiques ont été décrits récemment par Bowling et

Wynne [7, 8], à propos de l'action de *Kl. aerogenes* vis-à-vis de diverses espèces bactériennes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. FALTIN. *Zbl. Bakt.*, I. Abt. Orig., 1908, **46**, 6, 109 et 222.
- [2] F. KOCH et E. KRAEMER. *Zbl. Bakt.*, I. Abt. Orig., 1932, **123**, 308.
- [3] J. RÉGNIER et S. LAMBIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **199**, 1682.
- [4] M. GUNDEL et H. HIMSTEDT. *Munich. med. Wschr.*, 1925, **72**, 1674.
- [5] G. GILLIEN. *Zbl. Bakt.*, I., 1952, **159**, 98.
- [6] F. NEUFELD et H. KUHN. *Z. Hyg.*, 1934, **116**, 95.
- [7] R. BOWLING et S. WYNNE. *J. inf. Dis.*, 1951, **89**, 277.
- [8] E. S. WYNNE. *J. Bact.*, 1947, **53**, 469.
- [9] S. WAKSMAN. New-York, Commonwealth Fund 1947.
- [10] G. PAPACOSTAS et J. GATE. Paris, Doin, édit., 1928.
- [11] Y. CHABBERT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 51.

ACTION *IN VITRO* DES ANTIBIOTIQUES SUR 101 SOUCHES MALGACHES DE *PASTEURELLA PESTIS*

par E.-R. BRYGOO et J. COURDURIER.

(Institut Pasteur de Madagascar.)

Nous avons étudié le comportement de souches malgaches de *Pasteurella pestis*, *in vitro*, en présence des antibiotiques les plus couramment utilisés afin de disposer des données de base nécessaires pour guider utilement une thérapeutique.

TECHNIQUE. — Ne cherchant pas à faire une étude générale de l'action des antibiotiques sur *P. pestis* mais désirant seulement contrôler le comportement des souches locales avec les techniques d'un laboratoire de biologie clinique, nous avons utilisé la méthode des disques.

LES ANTIBIOTIQUES. — Nous disposions des antibiotiques sur disques préparés par l'Institut Pasteur de Paris :

Pénicilline, streptomycine, auréomycine, chloramphénicol, terramycine, tétracycline (sanclomycine-tétracine), érythromycine, bacitracine, néomycine, framycétine (soframycine).

Nous avons également des disques préparés par la maison Difco avec les antibiotiques suivants :

Bacitracin, terramycin, polymyxin B (aerosporin), dihydrostreptomycin, aureomycin, penicillin, chloromycetin.

Pour ces derniers produits nous avons des disques de trois concentrations différentes. Ceci nous a permis de mesurer, avec l'approxi-

mation que comporte une telle méthode, le degré de résistance ou de sensibilité des souches aux antibiotiques.

LES SOUCHES. — Mettant à profit l'importante collection réunie par les D^{rs} Girard et Robic (collection à laquelle nous avons joint quelques souches d'isolement plus récent), nous avons pu faire nos essais sur 113 souches :

101 souches malgaches de *P. pestis* : 94 souches de collection, 7 souches isolées depuis moins d'un an ;

et, à titre de témoins :

6 souches de *P. pestis* isolées en différentes parties du monde ;

6 souches de *P. pseudo-tuberculosis* de collection.

LES CULTURES. — Nous ensemençons X gouttes d'une culture de quarante-huit heures en bouillon Martin dans 10 cm³ de gélose Martin fondue et ramenée à la température de 45°. Le mélange est coulé en boîte de Petri.

LECTURE. NOTATION. — La lecture se fait après quarante-huit heures d'incubation à la température du laboratoire. On note la largeur de la couronne d'inhibition mesurée en millimètres. Dans la suite de ce travail nous désignerons les souches locales par les lettres P. P. M., les souches de *P. pestis* d'autre origine par les lettres P. P. et les souches de *P. pseudo-tuberculosis* par P. S. T.

RÉSULTATS. — a) Le tableau I résume les résultats obtenus en utilisant les disques préparés par l'Institut Pasteur de Paris.

TABLEAU I.

Souches essayées	P.P.M	P.P	P.P	P.S.T	P.P.M	P.P	P.P	P.S.T	P.P.M	P.P	P.P	P.S.T	P.P.M	P.P	P.P	P.S.T
	101	6	6	101	6	6	101	6	6	101	6	6	101	6	6	101
Antibi-otiques	Absence d'inhibition				Largeur de la couronne d'inhibition de 0 à 5mm				de 6 à 10mm				plus de 10mm			
Bacitracine	101	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythromycine	101	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline	27	-	-	69	6	4	4	-	2	1	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	11	4	-	89	2	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Framycétine	8	-	-	89	6	5	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Auréomycine	2	-	-	85	6	4	13	-	2	1	-	-	-	-	-	-
Terraamycine	-	-	-	94	6	5	6	-	1	1	-	-	-	-	-	-
Neomycine	-	-	-	74	5	4	26	1	2	1	-	-	-	-	-	-
Streptomycine	-	-	-	50	6	-	39	-	3	12	-	-	-	-	-	-
Chloramphenicol	-	-	-	-	-	-	32	4	2	69	2	4	-	-	-	-

Ce tableau indique :

1° Que deux antibiotiques, l'érythromycine et la bacitracine, se sont montrés inactifs à l'égard des 113 souches testées, c'est-à-dire que dans les conditions expérimentales données, aucune zone d'inhibition n'était visible autour de la pastille de papier.

2° Que quatre antibiotiques, la pénicilline, la tétracycline, la framycétine et l'auréomycine, peuvent être sans action *in vitro* sur certaines souches.

Le nombre des souches résistantes s'est élevé :

A 27 p. 100 pour la pénicilline ;

A 11 p. 100 pour la tétracycline ;

A 8 p. 100 pour la framycétine.

Par contre, il était plus faible pour l'auréomycine et n'a atteint que 2 p. 100.

3° Que quatre antibiotiques, la terramycine, la néomycine, la streptomycine et le chloramphénicol, ont eu une action nette sur toutes les souches essayées. Les deux antibiotiques les plus actifs *in vitro* furent la streptomycine et le chloramphénicol. Ce dernier a constamment présenté la plus large zone d'inhibition.

4° Qu'il n'y a pas de différence notable entre le comportement des souches de P. P. M. et celui des souches de *P. pestis* d'autres provenances. Par ailleurs nous avons noté une plus grande sensibilité des souches de P. S. T. à la pénicilline, à la tétracycline et à la streptomycine, mais étant donné le petit nombre de souches essayées nous réservons nos conclusions.

b) Les résultats obtenus en utilisant des disques antibiotiques préparés par la maison Difco sont présentés dans le tableau II. Dans ce tableau nous n'avons pas tenu compte de la largeur de la couronne d'inhibition, mais seulement de la présence ou de l'absence d'une telle zone.

TABLEAU II.

Antibiotique	Baci- tracin	Polymy- xin B	Peni- cillin	D.strepto- mycin	Terra- mycin	Aureo- mycin	Chloro- mycetin
Concentration et unité	20 u	10 mcg	10 u	100 mcg	30 mcg	10 mcg	10 mcg
Souches	Nombre						
P.P.M.	42	11 0	7 4 0	41 0	40 39 1	42 16	42
P.P.	6	1 0	4 2 0	6 0	6 5 1	6 4	6
P.S.T.	6	0 0	6 2 0	6 0	6 6 2	6 5	6

Ces essais montrent :

1° Que la bacitracin et la polymyxin B ne sont actives que sur un petit nombre de souches de *Pasteurella pestis* et seulement aux concentrations maxima utilisées.

2° Que la penicillin et la dihydrostreptomycin sont, aux concentrations maxima, actives sur la plupart des souches mais que certaines d'entre elles peuvent cependant se montrer résistantes dans les conditions de l'expérience.

3° Que la terramycin est active sur toutes les souches à la concentration de 30 mcg (les concentrations utilisées furent : 60, 30 et 10 mcg).

4° Que l'auréomycine et la chloromycétine sont actives sur toutes les souches, même à la concentration la plus faible utilisée (10 mcg).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Utilisant la méthode des disques antibiotiques nous avons étudié le comportement de 101 souches de *Pas-*

teurella pestis isolées à Madagascar. Les antibiotiques les plus actifs *in vitro* furent le chloramphénicol, l'auréomycine, la terramycine, la streptomycine et la néomycine

CRITIQUE DES RÉSULTATS DE LA MÉTHODE AU TEEPOL DILUÉ POUR L'ISOLEMENT DU BACILLE DE KOCH

par F. TISON et J. AUDRIN.

(*Sanatorium de Praz-Coutant.*)

Nous avons proposé une nouvelle technique simple [1] :

A 2 cm³ de crachats ajouter 4 cm³ de la solution :

Teepol, 25 cm³ ; soude en pastilles, 1 g ; eau distillée, 75 cm³.

Verser dans un tube à centrifuger conique, stérile de 60 cm³ ;

Agiter une demi-heure avec l'agitateur spécial [2] ;

Diluer avec la solution stérile :

Acide sulfurique à 66° B., 1 cm³ ; pourpre de bromocrésol, 1/250, 1 cm³ ;
eau distillée, q. s. p. 1 000 cm³,

en versant jusqu'à l'apparition de nuages jaunes (neutralisation).

Centrifuger à 3 000 tours, une heure, et ensemercer le culot sur six tubes.

Nous avons comparé cette méthode [3] avec celle à la soude précédemment employée [2]. La comparaison a porté sur 400 cultures. Chaque produit examiné était partagé en deux.

Chaque moitié était traitée, l'une par la soude à 4 p. 100, l'autre par le teepol, et chacuneensemencée sur 4 tubes, soit au total 3 200 tubes.

RÉSULTATS :

Depuis l'application de cette méthode nous avonsensemencé 966 produits pathologiques souillés, soit 3 796 tubes de Jensen :

Aucune culture n'a été souillée entièrement.

46 tubes ont été souillés sans compromettre toute la culture.

Devant ces résultats et dans le but d'étudier des perfectionnements, nous avons essayé de dissocier les facteurs qui entraient en jeu.

I. FACTEURS ENTRANT EN JEU AVANT L'ENSEMENCEMENT :

Nous avons essayé de comparer l'action sur le bacille de Koch « nu » de :

1° La soude à 4 p. 100 ;

2° La soude à 1 p. 100 ;

3° Le teepol à 25 p. 100 ;

4° Le teepol à 25 p. 100 + soude à 1 p. 100.

après une action d'une demi-heure.

TABLEAU I.

400 PRODUITS PATHOLOGIQUES	SOUDE à 4 p. 100	TEEPOL à 25 p. 100
Cultures positives	75	109
Cultures souillées par une flore indésirable <i>sur les</i> <i>6 tubes</i>	3	0
Tubes souillés sans compromettre forcément <i>toute</i> la culture	39	25
Temps moyen d'apparition des colonies suffisantes pour un repiquage (mesure de résistance)	25 jours	18 jours
Note proportionnelle au nombre de colonies : 1, rares colonies ; 2, quelques colonies ; 3, nombreuses colo- nies ; 4, incomptables	459	825

Des suspensions de plus en plus diluées, homogènes, de la souche H37Rv ont été faites. Toutes les précautions décrites par Leblois ont été prises pour obtenir les inoculats les plus équitables possibles.

1 cm³ de chaque dilution était prélevé et additionné de 2 cm³ des agents 1, 2, 3, 4.

Après une demi-heure la dilution-neutralisation étant obtenue comme dans la technique de culture, le tout a été centrifugé.

Le culot, en totalité, a été ensemencé sur trois tubes de Jensen de la même série de fabrication.

Un témoin pour chaque dilution était traité de la même manière (dilution, centrifugation).

La lecture a été faite sur les deux dernières dilutions ayant donné lieu à culture (10⁻² et 10⁻³ de la suspension mère) et après douze jours et dix-sept jours d'étuve.

Les résultats sont schématisés dans le tableau II.

Il semble que l'action temporaire du tensio-actif ne soit pas très néfaste au bacille.

Par contre, la soude, même à 1 p. 100, a une action retardatrice nette. La soude à 4 p. 100 est particulièrement néfaste.

TABLEAU II. — Moyenne des résultats.

		TÉMOIN	SOUDE 1 p. 100	SOUDE 4 p. 100	TEEPOL 25 p. 100	TEEPOL + SOUDE 25 p. 100 1 p. 100
Dilution 10 ⁻²	17 jours	++	0	0	++	++
	12 —	++++	++++	++	++++	++++
Dilution 10 ⁻³	17 —	++	0	0	++	+
	12 —	++	++	+	++	++

Il est à remarquer que « teepol + soude » semble moins empêchant que « soude » seule.

Le teepol semble, dans une certaine mesure, protéger le bacille tuberculeux contre l'action de la soude.

II. FACTEURS QUI INTERVIENNENT APRÈS ENSEMENCEMENT.

FACTEURS LIÉS A LA CORRECTION DU pH. — *Neutralisation proprement dite.* Le pH idéal 6,8 à 6,9 n'est jamais atteint exactement au cours de la neutralisation-dilution. Le virage du bleu au jaune a lieu entre 6,9 et 5,3 [5]. Le titrage précis « à la goutte » est difficile en bactériologie dans des conditions rigoureuses de stérilité.

Nous versons la solution acide très diluée en arrêtant à l'apparition de nuages jaunes au milieu de la couleur bleue du liquide. Nous évitons de pousser jusqu'au jaune, ce qui indiquerait une acidité trop forte.

La neutralité est, certes, approximative. Mais le très petit volume du culot en face de la masse du milieu (6 tubes) permet l'efficacité du pouvoir tampon du milieu de Jensen.

Le faible pourcentage d'acide (1 p. 100) permet d'éviter tout échauffement.

Le colorant indicateur : La quantité de pourpre de bromocrésol qui est ensemencée sur chaque tube est de l'ordre de 0,25 mcg.

Or, le pouvoir bactériostatique de ce réactif est de l'ordre de 0,025 p. 1 000. La marge de sécurité est donc satisfaisante.

Sulfate de soude : La soude étant neutralisée par l'acide sulfurique, la production de sulfate de soude est de l'ordre de 0,07 g, soit 0,2 mg par tube, ce qui est, nous l'avons déjà vérifié [4], sans action notable sur la végétation du bacille de Koch.

Etant donné les faibles quantités d'acide sulfurique en jeu, le temps de contact réduit et la température de la réaction, il est peu probable qu'il se forme des dérivés sulfonés toxiques, comme l'appréhendaient certains auteurs [6].

TABLEAU III. — Lecture au douzième jour.

	NUMÉRO DES TUBES					
	1	2	3	4	5	6
Tubes témoins . . .	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Tubes avec 3 doses de Teepol	++++	++	++++	+++	++++	+++
Tubes avec 30 doses de Teepol	+++	+	+	++	+++	++

Persistence du teepol : On peut évaluer à environ 0,6 mg la dose de produit actif accompagnant l'inoculat de chaque tube. Ce résidu de teepol persiste.

Pour étudier son action nous avons ensemencé une suspension de H37Rv à raison de 1/10 de centimètre cube sur des tubes de Jensen (témoin). Les autres séries de tubes ont reçu en outre trois fois et trente fois la dose ci-dessus de teepol.

La persistance de teepol a donc une légère action néfaste sur la végétation du bacille. Moins il persistera de mouillant et meilleure sera la méthode [4].

CONCLUSIONS. — Les résultats montrent que la méthode proposée semble moins mauvaise que les autres (plus sensible, plus rapide, moins de souillures). Les auteurs qui ont bien voulu l'essayer *dans le détail*, en particulier après l'avoir vu faire, ont confirmé nos résultats.

Le résidu de teepol doit être réduit au maximum. Le double lavage est à conseiller. Une deuxième centrifugation élimine par dilution la presque totalité du teepol. Elle corrige par la même occasion l'écart de pH et élimine le sulfate de soude ainsi que les substances empêchantes [4] dues à l'homogénéisation des protéines.

La soude à 1 p. 100 semble devoir être un écueil. Elle ne joue aucun rôle dans l'élimination des germes banaux. Elle est utile à une homogénéisation convenable.

Là doit porter notre effort pour un perfectionnement sensible. Ce travail est en cours.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. TISON. *Ces Annales*, 1955, **87**, 445.
- F. TISON et A. LOZE. *Ces Annales*, 1955, **87**, 735.
- [2] F. TISON. *Rev. Tuberc.*, 1953, **47**, 943.
- [3] F. TISON et J. AUDRIN. *Soc. Tub.*, janvier 1955.
- [4] F. TISON. *Ces Annales*, 1952, **82**, 484.
- [5] LOISELEUR. *Techniques de laboratoire*. Masson, édit., Paris, 1954, 15.
- [6] P. STRUB. *Thèse Paris*, 1954, 11.

MYCOSE CUTANÉE A CORPS LEVURIFORMES OBSERVÉE CHEZ DES SINGES AFRICAINS EN CAPTIVITÉ

par G. COURTOIS, G. SEGRETAIN, F. MARIAT et J.-C. LEVADITI.

(Institut Pasteur, Paris.)

Il nous a été donné d'observer une mycose spontanée du singe qui n'a pas encore été décrite à notre connaissance. Cette maladie a été découverte fortuitement à l'examen histologique d'une lésion cutanée

prélevée à l'autopsie d'un cynocéphale (1), puis retrouvée chez deux autres cynocéphales ; ces *Cynocephalus babuin* étaient des mâles arrivés de la région de Kindia (Guinée Française), en 1953 et 1954 et vivaient depuis lors en captivité à la singerie de l'Institut Pasteur. Ils étaient porteurs de multiples nodules cutanés souvent fistulisés et parfois ulcérés.

La lésion élémentaire se présente comme une papule ou un nodule violacé de 0,5 à 1 cm de diamètre, à centre plus clair, correspondant à une masse dermo-hypodermique, qui peut être soit petite et dure, ayant la consistance d'un grain de plomb, soit plus volumineuse et alors pseudo-fluctuante. Dans ce dernier cas, la peau amincie, brillante, violacée, peut se perforer et par la fistule ainsi formée s'écoule un pus jaunâtre, crémeux. Des ulcérations planes, arrondies et de taille variable, semblent correspondre à d'anciens nodules fistulisés ; le fond de l'ulcération, peu suppurant, saigne facilement et est bordé d'un bourrelet épidermique plus ou moins saillant.

Dans la région fessière des trois singes, des nodules durs, mobiles sur le plan profond, fistulisés et ulcérés sont, soit isolés, soit nombreux et conglomérés. On en trouve également tout le long de la queue et adhérents au plan profond chez un de ces animaux ; chez un autre, le membre supérieur gauche présente une plaie ulcérée du médius mesurant 2 cm de diamètre, et dans la région du poignet, une tuméfaction de 3 cm sur 2 cm, fistulisée latéralement. A l'autopsie de deux des trois singes atteints de maladie spontanée, aucune lésion viscérale notable n'a pu être rapprochée des lésions dermiques observées.

Sur coupes de prélèvements biopsiques ou nécropsiques, la lésion se présente comme un granulome par corps étranger, peu vascularisé et constitué presque uniquement de nombreux plasmodés bourrés de formes levures arrondies ou ovalaires refoulant les noyaux à la périphérie. Le nodule se situe soit dans l'hypoderme, laissant le derme et l'épiderme intacts, soit intéresse également le derme sous un épiderme atrophique quand il n'est pas ulcéré. Ce nodule est presque toujours entouré d'une fibrose considérable qui peut diviser la tumeur en éléments multiples.

Entre ces plasmodés, souvent accompagnés de macrophages parasités, il existe une infiltration séreuse ou séro-fibrineuse contenant d'assez nombreux polynucléaires qui peuvent pénétrer les plasmodés et réaliser des zones de nécrose purulente où les formes levures sont à l'état libre. On peut constater une trame de collagène très marquée par places, encerclant plasmodés et macrophages et près des vaisseaux des infiltrats lympho-plasmocytaires dépourvus d'éosinophiles.

Dans le pus examiné à l'état frais sans coloration, pullulent des formes levures ellipsoïdes mesurant en moyenne $8,2 \times 6,9 \mu$, isolées ou en chaînettes de 2, 3, 4 ou même 5 éléments unis par leur grand axe. Elles sont entourées par une membrane épaisse à double contour ; à l'intérieur on distingue presque toujours des granules arrondis, parfois multiples et de même diamètre, mais le plus souvent uniques

(1) Ce cynocéphale avait été autopsié au service des Virus et les fragments prélevés ont été mis à notre disposition par M. Lépine et ses collaborateurs. Qu'ils trouvent ici nos remerciements.

et de diamètre variable pouvant occuper presque tout le centre de la cellule. Certains éléments sont en voie de bourgeonnement et le bourgeon limité par une paroi mince est relié à la cellule mère par un isthme large ; il s'en sépare par une membrane. Sur coupe histologique, le parasite intracellulaire se colore remarquablement par la technique de Hotchkiss-MacManus ; il se présente sous une forme ronde ou ellipsoïde, suivant l'angle de vue ; dans le protoplasme finement délimité et détaché de la membrane, des granulations de forme variable prennent fortement le colorant. Sur coupe, certains éléments ont des dimensions beaucoup plus grandes, pouvant atteindre $13 \times 10 \mu$ de diamètre.

Nous n'avons pu jusqu'ici obtenir le parasite en culture à partir du pus ou de fragments biopsiques ensemencés sur les milieux les plus divers employés en mycologie et placés aux températures de 20, 25, 30 et 37°. D'autre part, des inoculations de pus ou de broyats de lésions par les voies diverses à la souris, au cobaye, au hamster et au singe n'ont pas encore provoqué, depuis plus de deux mois, l'apparition de lésions visibles, même après autopsie de certains animaux. Enfin chez les singes des intradermo-réactions à l'histoplasmine, même non diluée, et à la blastomycétine, effectuées dans la région intérieure de la cuisse, ont été totalement négatives.

Malgré l'absence de culture du parasite, nous pensons que cette affection cutanée du singe doit rentrer dans le cadre de l'histoplasmose à grande forme : en effet, la lésion cutanée, son aspect histologique, la localisation intracellulaire du parasite et sa morphologie sur coupe et dans le pus sont absolument superposables aux descriptions des histoplasmoses cutanées décrites chez l'homme par divers auteurs. En particulier, Catanei et Kervran [1] semblent bien être les premiers à en faire une description complète avec identification du parasite à *Histoplasma capsulatum*. Dans d'autres cas comme celui de Dubois et coll. avec note mycologique de Vanbreuseghem [2], il y a propagation ganglionnaire. Or, à l'autopsie de l'un de nos singes présentant des lésions du membre supérieur gauche, le ganglion axillaire hypertrophié est parasité par de grosses formes levures. Enfin la localisation peut être profonde et en particulier hépatique comme dans le cas de Duncan [3] et dans celui de Bablet, Jonchère et Martin [4] où ces derniers auteurs, en l'absence de culture du parasite, ont cependant pensé à une histoplasmose par similitude avec le cas décrit par Kervran et Aretas [5].

Cette hypothèse de la nature histoplasmique des lésions chez nos singes appelle trois remarques. L'absence de réaction cutanée à l'histoplasmine pourrait s'expliquer par le défaut de réponse allergique signalé en particulier chez les singes inférieurs [6]. D'autre part, Vanbreuseghem et coll. après inoculation de pus humain à *Histoplasma duboisii* (*Histoplasma* à grande forme) ont attendu dix mois pour constater l'infection des animaux [7]. N'en a-t-il pas été de même pour le premier cas d'histoplasmose humaine observé en A. E. F. par Audebaud, Merveille, Laluque et Depoux ? Les inoculations du pus au singe, au lapin et à la souris par différentes voies étaient encore négatives au bout de cinq mois ; en revanche, dans les mêmes conditions le cobaye s'est montré sensible aux inoculations intratesticulaires

et sous-cutanées [8]. Tout ceci expliquerait le défaut de réponse de nos animaux, deux mois après leur inoculation expérimentale. Enfin la difficulté d'obtention du parasite en culture est à rapprocher du petit nombre de primo-cultures obtenu par Vanbreuseghem en comparaison du grand nombre de cellules ensemencées [2].

En conclusion, les caractères de la maladie, la morphologie des lésions et des formes levures qu'elles contiennent, restent des arguments positifs en faveur d'une histoplasmosc africaine dont la valeur ne saurait être entamée par les essais biologiques encore négatifs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. CATANEI et P. KERVAN. *Arch. Inst. Past. Algérie*, 1945, **23**, 169.
- [2] A. DUBOIS, P. G. JANSSENS, P. BRUTSAERT et R. VANBREUSEGHEM. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1952, **32**, 569.
- [3] J. T. DUNCAN. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.*, 1946-1947, **40**, 364.
- [4] J. BABLET, M. JONCHÈRE et M. MARTIN. *La Presse Médicale*, 57^e année, n° 81, 1237.
- [5] P. KERVAN et R. ARETAS. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1947, **40**, 270.
- [6] E. BURNET. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **73**, 248.
- [7] R. VANBREUSEGHEM, A. DUBOIS, P. BRUTSAERT et P. G. JANSSENS. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1953, **33**, 171.
- [8] G. AUDEBAUD, P. MERVEILLE, P. LALUQUE et R. DEPOUX. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 803.

RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LES TRÉPONÈMES ANAÉROBES

II. — *T. MINUTUM*

par MICHEL MOUREAU.

(avec la collaboration technique de N. ALADAME.)

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

Nous avons pu cultiver en milieu liquide une espèce de tréponème anaérobie *T. minutum* sur lequel nous nous sommes livrés aux mêmes recherches que sur quatre autres espèces [1]. Ce germe, d'origine génitale comme *T. refringens*, *T. phagedenis* et *T. calligya*, est le plus petit de cette flore. Il a 6 à 10 μ de long, 6 à 10 tours de spires étroits et serrés, chaque extrémité est munie d'un petit crochet latéral ; mouvement hélicoïdal assez rapide et de peu d'amplitude qui lui confère une apparence rigide. Anaérobie strict, sérophile obligatoire, il pousse bien sur les milieux solides classiques de Vincent avec fragments de rein frais en donnant des colonies floues, et plus difficilement sur milieu liquide: Sa culture n'est pas gazogène, il ne résiste pas à la chaleur. Vitalité environ un mois. Il ne liquéfie pas la gélatine, ni le sérum coagulé, est sans action sur le lait, n'attaque pas le glucose.

Il noircit la gélose au sous-acétate de plomb. Il réduit définitivement la safranine, la phéno-safranine et le rouge neutre. Son pouvoir pathogène est nul.

RÉSULTATS BIOCHIMIQUES. — Le milieu de culture liquide utilisé est comme précédemment [2] une macération de composition chimique non définie, nous avons donc pu réaliser pour chacune des analyses chimiques deux séries d'épreuves portant, l'une sur le milieu stérile, l'autre sur le milieu après culture.

	PRODUITS RÉSULTANT DE LA DISTILLATION	
	Alcaline	Acide
Milieu non ensemencé : lot, Vz 22; pH, 7,6. .	NH ₃ : 0,70 g/l.	Acidité volatile totale : 0,30 g/l. Absence d'acide fixe.
Milieu après culture de 6 jours : pH, 7,2. . .	NH ₃ : 1,70 g/l. Indol : $\pm\pm\pm$ Cétones : ++ Amines : traces.	Acidité volatile totale : 1,85 g/l. Duclaux sur les acides volatils : Acide propionique et formique : 5/1. Absence d'acide fixe.

La réaction à l'indol très franchement positive de ce germe le rapproche plus particulièrement de *T. refringens*, car les autres tréponèmes ne présentent en général que des quantités très faibles de ce produit. Sa production d'ammoniac est de 1 g/l. Le type fermentaire : propionique/acétique est à comparer avec celui de *T. comandoni*.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Michel MOUREAU. Ces *Annales*, 1955, **88**, 231.

[2] R. VINZENT, P. SÉGUIN et DAUFRESNE. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **416**, 496.

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC EXPÉRIMENTAL DE LA FIÈVRE BOUTONNEUSE

par D. BALDUCCI et A. FELICI.

(Centro di Virologia, Ospedale S. Camillo de Lellis, Roma.)

Aujourd'hui le diagnostic clinique de la fièvre boutonneuse ou fièvre méditerranéenne a sa confirmation dans les résultats positifs, généralement tardifs, de la réaction de Weil-Felix, lorsqu'elle atteint un titre significatif ($\geq 1 : 320$).

Mais la réaction de Weil-Felix, ainsi que toutes les réactions faites avec des antigènes aspécifiques, peut donner un résultat négatif pendant toute la maladie, ce qui est un défaut. De même, elle ne fournit pas, en cas de positivité, de données différentielles certaines pour les différentes formes exanthématiques [4, 2].

Comme il n'est pas possible d'avoir sur le marché un antigène spécifique pour la fièvre boutonneuse, nous avons cru bon de faire des recherches avec la fixation du complément sur les variations du taux des anticorps qui apparaissent à la suite de cette maladie, en comparant les antigènes d'autres rickettsioses.

CAS CLINIQUES. — Nous avons fait des recherches dans six cas, dont le diagnostic clinique avait été celui de fièvre boutonneuse ou méditerranéenne. Dans chaque cas on avait pris deux échantillons de sérum, le premier pendant la phase aiguë de la maladie, le deuxième après quinze jours en moyenne. Avec ces six doubles échantillons de sérum, on a fait la réaction de Weil-Felix avec les souches OX-19, OX-2, de *B. proteus*, et aussi la fixation du complément avec les antigènes de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses (F. P. M. R.), de la rickettsiose vésiculeuse (rickettsial-pox), du typhus exanthématique épidémique, du typhus murin, de la fièvre Q et de la fièvre à tiques du Colorado.

Nos résultats sont résumés dans le tableau ci-joint. Bien que peu nombreux, ils sont significatifs. Dans tous les cas nous avons mis en évidence une augmentation très marquée du titre des anticorps pour la rickettsiose vésiculeuse. Mais nos cas ne sont pas des cas de rickettsiose vésiculeuse, soit à cause des données épidémiologiques, parce qu'ils appartiennent à la région de la Méditerranée, soit à cause

CAS CLINIQUES	AGGLUTINATION			DÉVIATION DU COMPLÉMENT				
	OX 19	OX-2	FPMR	Rickettsial-pox	Typhus épidémique	Typhus murin	Fièvre Q.	Fièvre du Colorado
1) <i>B. Ferdinando</i>								
1 ^{er} échantillon. .	Neg.	—	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 80	—	< 1 : 4	> 1 : 128	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2) <i>B. Salvatore</i>								
1 ^{er} échantillon. .	Neg.	—	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 160	—	1 : 64	> 1 : 128	1 : 8	< 1 : 4	1 : 8	1 : 8
3) <i>F. Maria</i>								
1 ^{er} échantillon. .	Neg.	—	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 160	—	< 1 : 4	1 : 64	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 4	1 : 8
4) <i>M. Piétro</i>								
1 ^{er} échantillon. .	1 : 320	1 : 320	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 1 280	1 : 320	1 : 32	> 1 : 128	1 : 8	< 1 : 4	1 : 16	1 : 128
5) <i>N. Valentina</i>								
1 ^{er} échantillon. .	1 : 320	—	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 640	—	< 1 : 4	> 1 : 128	< 1 : 4	< 1 : 4	1 : 16	< 1 : 4
6) <i>R. Davide</i>								
1 ^{er} échantillon. .	Neg.	—	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4
2 ^e échantillon. .	1 : 20	—	< 1 : 4	> 1 : 128	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4	< 1 : 4

des données sérologiques, parce qu'il y a une augmentation du titre de la réaction de Weil-Felix [3].

L'augmentation des anticorps pour la rickettsiose vésiculeuse, dans les cas de fièvre boutonneuse, ne nous surprend pas, car nous connaissons les affinités des antigènes des rickettsioses en général et celles du groupe F. P. M. R. en particulier.

On peut relever aussi que la Weil-Felix, dans quatre cas (nos 1, 2, 3, 6), n'était pas encore significative, quand le titre d'anticorps pour la rickettsiose vésiculeuse était, lui, très significatif. Ce fait pourrait avoir une grande valeur pour le diagnostic de la fièvre boutonneuse de la Méditerranée, s'il était confirmé par une statistique plus importante.

CONCLUSION. — La positivité constante de la fixation du complément pour la rickettsiose vésiculeuse observée dans nos six cas, nous porte à conseiller l'emploi de ce test pour le diagnostic précoce de la fièvre boutonneuse, quand les cas se rencontrent dans la région de la Méditerranée. La réaction de Weil-Felix pourrait être employée secondairement pour exclure la possibilité de l'existence, non encore démontrée, de la rickettsiose vésiculeuse dans la région de la Méditerranée.

RÉSUMÉ. — La fixation du complément a été conduite sur de doubles échantillons de sang de six malades de fièvre boutonneuse de la Méditerranée, en employant les antigènes de la fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses, de la rickettsiose vésiculeuse, du typhus épidémique, du typhus murin, de la fièvre Q, de la fièvre du Colorado. On a déterminé le titre d'agglutination pour les souches de *B. proteus* OX-19 et OX-2. Les résultats ont permis de constater que, au cours de la fièvre boutonneuse de la Méditerranée, une positivité marquée pour l'antigène de la rickettsiose vésiculeuse peut apparaître bien avant l'agglutination pour *B. proteus* (1).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. DURAND. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1932, **20**, 395.
- [2] F. DONZELLI. *Ann. San. Pubbl.*, 1950, **41**, 887.
- [3] R. J. HUEBNER, W. L. JELLISON et C. ARMSTRONG. *Pub. Hlth Rep.*, 1947, **62**, 777.

(1) Nous remercions les professeurs Archetti et Babudieri de l'Istituto Superiore di Sanità de Rome, le professeur Weyer du Tropic-Institut de Hambourg, et le Dr Lackman du Laboratoire des Montagnes-Rocheuses, pour leur conseils et suggestions.

**ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE *COXIELLA BURNETI*
A L'OCCASION
D'UNE RECHUTE DE FIÈVRE Q HUMAINE**

par L. BERTRAND et J. ROUX.

(*Clinique des maladies infectieuses* [professeur M. JANBON] et *Laboratoire de Microbiologie* [professeur L. CARRÈRE] de la Faculté de Médecine de Montpellier.)

La rareté des souches de *Coxiella burneti* isolées chez l'homme est certainement due au fait que le diagnostic de la maladie humaine est le plus souvent tardif, voire même rétrospectif : dans ces conditions il ne peut être affirmé que par la sérologie. La souche dont nous rapportons l'étude est, à notre connaissance, la seconde isolée en France, la première l'ayant été par Schuch, en 1948, à Strasbourg. La malade de qui nous l'avons obtenue avait eu une fièvre Q authentifiée par déviation du complément positive ; elle était apparemment guérie par le chloramphénicol lorsqu'elle fit une rechute un mois plus tard. Dès le premier jour de la rechute, son sang fut inoculé dans le péritoine de cinq cobayes et de cinq souris, ainsi que dans le sac vitellin de deux embryons de poulet.

Quatre cobayes sur cinq firent une poussée fébrile le huitième jour. Deux moururent les treizième et quatorzième jours : des rickettsies ont été retrouvées dans les frottis de leur rate. Deux autres cobayes élaborèrent entre le vingt-cinquième et le trente-cinquième jour des anticorps spécifiques qui permirent d'identifier la souche. Un seul cobaye resta indemne.

Les souris ne sont pas mortes, mais au dixième jour, des rickettsies ont été vues dans l'exsudat péritonéal et dans la rate de deux d'entre elles sacrifiées.

Aucune rickettsie n'a été retrouvée dans les sacs vitellins d'œufs embryonnés directement inoculés avec le sang de la malade.

Deux cobayes inoculés avec les urines n'ont pas réagi.

L'étude du pouvoir pathogène pour le cobaye et des caractères sérologiques de cette souche est analysée ci-après.

POUVOIR PATHOGÈNE SUR LE COBAYE. — Dix cobayes sont inoculés par voie intrapéritonéale avec un broyat de rate de cobaye mort treize jours après avoir reçu le sang de la malade. Neuf font une poussée fébrile entre le septième et le douzième jour. Quatre meurent : deux au treizième jour, un au seizième, un au trentième. Des six cobayes survivants, cinq montrent des anticorps. Cette souche infecte donc sûrement neuf cobayes sur dix, en tue quatre sur dix. Parmi les animaux

morts, des rickettsies sont retrouvées dans la rate de deux sur quatre, mais on ne constate pas les adhérences péritonéales fréquemment décrites. Un cobaye survivant, sérologiquement positif, sacrifié deux mois plus tard, ne montre pas davantage de lésions et l'on ne retrouve pas de rickettsies dans la rate.

POUVOIR ANTIGÉNIQUE. — Les anticorps sont recherchés au quinzième, vingt-cinquième, trente-cinquième et soixantième jour. Nous utilisons la déviation du complément, technique Kolmer, selon la méthode quantitative codifiée par Kaplan à l'O. M. S. L'antigène utilisé est celui des laboratoires Lederle, préparé avec la souche italienne Henzerling.

Quinze jours après l'inoculation, le sérum des huit cobayes survivants ne dévie pas le complément (l'un d'eux devait mourir le lendemain). Au vingt-cinquième jour trois cobayes sur sept ont un titre d'anticorps de 1/16, 1/16 et 1/32 respectivement. Un cobaye qui mourra cinq jours plus tard est négatif. Le trente-cinquième jour, quatre cobayes sur six ont les titres suivants : 1/16, 1/128, 1/32 et 1/64. Enfin, au soixantième jour, cinq cobayes ont des anticorps au taux de 1/16, 1/128, 1/64, 1/64 et 1/16 ; le dernier survivant est resté constamment négatif. La souche que nous étudions a donc un faible pouvoir antigénique, ne déclenchant que tardivement des anticorps.

Par son faible pouvoir pathogène sur le cobaye, cette *Coxiella* s'apparente aux souches du type Henzerling (souche italienne), qui s'opposent au type Dyers dont le pouvoir léthal pour le cobaye est de 100 p. 100. Par contre, plusieurs souches du type Henzerling posséderaient deux types d'antigènes, mis en évidence par leurs anticorps correspondants, les uns étant d'apparition précoce, les autres tardifs. De ce point de vue, il semble que notre souche ne possède qu'un type d'antigène ; mais il s'agit là de critères bien fragiles pour servir de base à une classification. Pour l'instant, il nous paraît raisonnable de ne prendre en considération que le pouvoir pathogène expérimental.

LES DISQUES SÉCHÉS POUR L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME GLUCIDIQUE MICROBIEN

par J. P. LUCE

Les carbohydrases sécrétées par les microbes attaquent les glucides et les transforment en alcool, aldéhydes, acides fixes ou volatils.

Dans l'étude d'une famille, d'un genre ou d'une espèce microbienne la mise en évidence de la dégradation ou de l'absence de dégradation de certains glucides par le germe est une étape essentielle de l'identification.

Actuellement cette étude se fait en ensemencant un milieu composé d'une base (gélose ou eau peptonée) additionnée d'une solution du glucide dont on veut observer l'attaque. Celle-ci est mise en évidence par le virage d'un indicateur de pH (bleu de tournesol ou rouge de phénol) ajouté au milieu.

La préparation de ces milieux est relativement longue et coûteuse et surtout l'étude de chaque glucide exige un tube de milieu.

Une simplification est déjà intervenue avec l'emploi de certains artifices, tel le milieu composé de Hajna-Roland qui, dans un seul tube, permet d'étudier la fermentation du glucose, du lactose et la formation d'H₂S.

Nous avons pensé pouvoir appliquer à l'étude du métabolisme glucidique la méthode de diffusion en gélose à l'aide de disques séchés.

Le principe de notre méthode est le suivant : une gélose additionnée de rouge de phénol est coulée en boîte de Petri. On ensemence la gélose avec le germe étudié et on dépose sur la surface un certain nombre de disques imprégnés des différentes solutions de glucides dont on veut étudier l'attaque par le germe.

Chaque glucide diffuse dans la gélose de quelques millimètres autour du disque et si le microbe attaque le glucide correspondant, on constate un virage au jaune du rouge de phénol autour du disque, sinon le milieu reste inchangé.

Le matériel employé est préparé de la façon suivante :

Nous employons des disques de papier buvard (force 250 g), diamètre 10 mm.

Ces disques sont immergés pendant vingt-quatre heures dans la solution de glucides dont on veut les imprégner.

Nous employons des solutions de glucides à 30 p. 100.

Après vingt-quatre heures d'immersion, les disques sont desséchés à 40°. Ils sont ensuite stockés en tubes stériles, bouchés avec des bouchons de caoutchouc en présence d'un desséchant.

Toutes ces opérations sont faites en milieu stérile.

La gélose au rouge de phénol est préparée de la façon classique par addition de 3 cm³ de rouge de phénol R. A. L. à 40 cm³ de gélose, afin d'obtenir une coloration rouge cerise bien nette.

Pour les germes délicats, on peut ajouter de l'ascite ou de l'extrait globulaire.

Le milieu est coulé en boîte de Petri et soigneusement débarrassé de la vapeur d'eau. Nous insistons sur ce temps essentiel nécessaire à une diffusion standard des glucides dans la gélose.

La boîte est ensemencée d'une façon régulière et abondante à l'aide d'une pipette coudée avec la souche pure à étudier.

On dépose ensuite sur le milieu quatre à cinq disques imprégnés des glucides dont on veut étudier la fermentation. Ces disques sont déposés de telle façon qu'ils soient espacés de 2 à 3 cm, afin que les zones de diffusion n'interfèrent pas.

La lecture se fait après douze à dix-huit heures d'étauve. Dans le cas particulier des Entérobactériacées, il est nécessaire de surveiller le virage dès la douzième heure, car passé un certain délai nous avons constaté une réversibilité du virage.

Nos essais ont porté sur les souches suivantes :

Collibacilles (<i>E. coli</i>)	32
<i>Proteus</i> (<i>P. morganii</i>)	19
<i>Salmonella</i> (<i>S. paratyphi</i> B)	3
<i>Neisseria</i> (<i>N. gonorrhœae</i>)	6
<i>Neisseria</i> (<i>N. catarrhalis</i>)	18
Staphylocoques (<i>St. aureus</i>)	20
Pneumocoques (<i>D. pneumoniae</i>)	5
Diphthériques (<i>C. diphtheriae</i>)	5
Pseudo-diphthériques (<i>C. hoffmanni</i>)	17
<i>Pseudomonas</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	15

Chaque germe fut testé parallèlement selon les méthodes classiques d'étude du métabolisme glucidique microbien et par la technique des disques séchés.

Nous avons étudié 140 souches : 134 résultats furent entièrement concordants ; 6 résultats furent discordants.

Trois *E. coli* n'attaquèrent pas le saccharose par la méthode des disques, alors que l'attaque avait lieu en eau peptonée. Ce caractère n'étant pas constant pour *E. coli*, nous avons pensé que la diffusion du sucre à partir du disque était insuffisante pour se manifester en gélose.

Deux *Pseudomonas* nous ont donné des résultats complètement discordants par les deux méthodes. Il s'agissait de souches produisant une grande quantité de pigment. Peut-être le pigment a-t-il gêné le virage du rouge de phénol.

Un pseudo-diphthérique n'a pas attaqué le saccharose sur milieu aux disques séchés, alors qu'il le faisait en milieu de Hiss. Peut-être s'agissait-il d'une souche particulièrement sensible à l'absence du sérum dans le milieu où la culture fut assez pauvre.

Nous pensons que nos essais offrent certains avantages sur les méthodes classiques.

Notre technique est rapide et simple : une seule boîte à préparer, cinq à six disques à déposer et on obtient les caractéristiques glucidiques d'un germe. Elle présente en outre l'avantage d'être économique par la réduction du nombre des milieux à utiliser. Une boîte de Petri remplace une galerie de tubes.

Ces premières données nous amènent à penser que la méthode des disques séchés pour diffusion en gélose offre d'autres possibilités.

Nous continuons l'étude du métabolisme glucidique, afin d'appuyer nos résultats sur un plus grand nombre d'essais. D'autre part, nous envisageons d'étendre la méthode à d'autres techniques bactériologiques.

RÉSUMÉ. — Des disques de papier buvard sont imprégnés avec les différentes solutions de glucides usuels à 30 p. 100. Ils sont séchés et stockés. Ces manipulations sont faites stérilement.

Lorsqu'on désire étudier le métabolisme glucidique d'un germe, on coule une gélose additionnée de rouge de phénol en boîte de Petri. On ensemence la boîte avec le germe étudié.

On dépose à la surface de la gélose cinq à six disques imprégnés

des solutions de glucides dont on désire étudier la fermentation. Le glucide diffuse de quelques millimètres dans la gélose.

Si le glucide est fermenté, le rouge de phénol vire au jaune en auréole autour du disque. Sinon le milieu reste inchangé.

Cette technique permet avec une seule boîte de Petri et quelques disques séchés de remplacer une galerie de tubes dans l'étude du métabolisme glucidique d'un germe.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude de l'induction par l'irradiation ultraviolette de quelques cultures d'E. coli K 12 préalablement rendues colicinogènes par transduction, par Y. HAMON et Z. V. LEWE.

Sur la conservation et la destruction dans les peaux du virus de la myxomatose des lapins, par H. JACOTOT, A. VALLÉE, B. VIRAT et A. LE PRIOL.

L'action *in vitro* de l'isonicotihydrazone de la métrasulfobenzaldéhyde (605 G) sur des souches de bacilles tuberculeux, par A. LUTZ et M^{me} A. WITZ.

L'action de l'isonicotihydrazone de la métrasulfobenzaldéhyde (605 G) sur la tuberculose expérimentale du cobaye. I. Après inoculation de bacilles tuberculeux sensibles à la streptomycine et à l'isoniazide et traitement *per os*, par A. LUTZ et M^{me} A. WITZ.

Comportement *in vivo* et *in vitro* de *Pasteurella tularensis* isolée au cours de l'évolution de la tularémie chez des hôtes diversement réceptifs, par G. GIRARD.

LIVRES REÇUS

J. Enselman et J.-C. Dreyfus. — Séméiologie électrophorétique des protéines du plasma sanguin et de l'hémoglobine. 1 vol., 226 p., Editions Camugli, Lyon. Prix : 2 000 fr.

Les auteurs ne croient pas que chacune des maladies étudiées au moyen de la méthode électrophorétique comporte un schéma original caractéristique de cette affection, mais plutôt que chaque anomalie électrophorétique représente seulement un symptôme qu'il convient d'interpréter en fonction des autres symptômes cliniques ou chimiques, et qui sera intégré dans un ensemble clinique. C'est cette conception

qui explique le titre de leur ouvrage. Celui-ci est divisé en cinq parties : les bases physiques de la sémiologie électrophorétique, ses bases chimiques (étude de l'albumine et protéines du plasma, glucoprotéines, lipoprotéines, globulines gamma, fibrinogène) ; ses bases cliniques (les données de l'électrophorèse dans les diverses maladies) ; une quatrième partie est consacrée à l'étude de l'hémoglobine et une cinquième décrit les différentes techniques d'électrophorèse et les dispositifs utilisés. L'ouvrage est complété par une bibliographie de 83 références.

H. T.

Ciba Foundation Symposium on chemistry and biology of pteridines.

1 vol., 425 p., 143 fig. J. et A. Churchill édit., Londres, 1954.

Prix : 42 shillings.

Comme les précédents, ce volume contient toutes les communications qui ont été présentées à ce Symposium, suivies de leurs discussions. De nombreux auteurs y ont apporté leur contribution. L'ouvrage est divisé en deux parties : la première étudie la chimie des ptéridines, la seconde, leurs propriétés biologiques. Il sera précieux à tous ceux qui s'intéressent à la chimie organique, la biochimie, la physiologie cellulaire, la bactériologie, la pharmacologie, la physiologie des insectes et aux recherches sur la leucémie.

H. T.

Cellular metabolism and infections. 1 vol., 196 p., Academic Press Inc.

édit., New-York, 1954. Prix : \$ 4,80.

Le volume contient les communications qui ont été présentées au Symposium qui s'est tenu à la New York Academy of Medicine les 4 et 5 mars 1954. Le programme de ce Symposium, qui réunissait surtout des chercheurs américains, était divisé en deux parties : 1° Biochimie comparée, qui traite des diverses structures et du métabolisme de l'hôte et du parasite ; 2° Métabolisme du processus infectieux lui-même. Il s'étend à l'étude des enzymes dans les microorganismes et dans le tissu animal lui-même, à la chimiothérapie et à l'infection des bactéries par le bactériophage. Chaque article comporte sa bibliographie.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.